(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)公表特許公報（Ａ）　(11)特許出願公表番号

特表2015-528310

（Ｐ２０１５－５２８３１０Ａ）

(43)公表日　平成27年9月28日(2015.9.28)

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード(参考)
Ｃ１２Ｎ　15/09	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ	２Ｂ０３０
Ｃ１２Ｎ　1/21	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/21		４Ｂ０２４
Ｃ１２Ｎ　5/10	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０３	４Ｂ０５０
Ｃ１２Ｐ　21/02	(2006.01)	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	４Ｂ０６４
Ａ０１Ｈ　1/00	(2006.01)	Ａ０１Ｈ	1/00	Ａ	４Ｂ０６５

審査請求　未請求　　予備審査請求　未請求　（全82頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-532063(P2015-532063)
(86)(22)出願日　平成25年9月13日(2013.9.13)
(85)翻訳文提出日　平成27年5月12日(2015.5.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/059598
(87)国際公開番号　WO2014/043435
(87)国際公開日　平成26年3月20日(2014.3.20)
(31)優先権主張番号　61/701,037
(32)優先日　平成24年9月14日(2012.9.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/766,057
(32)優先日　平成25年2月18日(2013.2.18)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/790,404
(32)優先日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　507124988
バイエル　クロップサイエンス　エルピー
ＢＡＹＥＲ　ＣＲＯＰＳＣＩＥＮＣＥ　ＬＰ
アメリカ合衆国　２７７０９　ノースカロライナ州　リサーチ　トライアングル　パーク　ティ．ダブリュ．アレクサンダー　ドライブ　２
(71)出願人　507203353
バイエル・クロップサイエンス・アクチェンゲゼルシャフト
ドイツ国、４０７８９・モンハイム、アルフレート－ノベル－シユトラーセ・５０
(74)代理人　100117787
弁理士　勝沼　宏仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＰＰＤ変異体および使用方法

(57)【要約】
細菌、植物、植物細胞、組織、および種子に、除草剤に対する耐性を付与する組成物および方法が提供される。組成物には、除草剤に耐性のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらのポリヌクレオチドを含むベクター、および該ベクターを含む宿主細胞が包含される。本発明のヌクレオチド配列は、微生物および植物を包含する生物における形質転換および発現のためのＤＮＡコンストラクトまたは発現カセット内で用いることができる。組成物には、形質転換された細菌、植物、植物細胞、組織、および種子もまた包含される。特に、ＨＰＰＤ阻害剤耐性ポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドが提供される。加えて、該ポリヌクレオチドに対応するアミノ酸配列も包含される。

1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）酵素をコードする組換え核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号１に対して少なくとも５５％の配列同一性を有し、かつ
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、グリシン、またはセリン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置１８９に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、システイン、またはアルギニン
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、セリン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、またはグルタミン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリンまたはトリプトファン、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、アラニン、またはセリン、
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、アラニン、バリン、またはグルタミン酸、および
（ｇ）配列番号１のアミノ酸の位置２１５に対応するアミノ酸の位置におけるロイシン
からなる群より選択される、１以上のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列またはその断片をコードし、
前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性である、組換え核酸分子。
【請求項２】
前記アミノ酸配列が、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、または

2

（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミンを有し、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性である、請求項１に記載の組換え核酸分子。
【請求項３】
前記核酸配列が、配列番号３～５９のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその断片をコードする、請求項１に記載の組換え核酸分子。
【請求項４】
ＨＰＰＤ酵素をコードする組換え核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその断片をコードし、前記ＨＰＰＤが以下のアミノ酸置換、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、または
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
を単数または複数含み、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性である、組換え核酸分子。
【請求項５】
ＨＰＰＤ酵素をコードする組換え核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその断片をコードし、前記ＨＰＰＤが以下のアミノ酸置換、
（ａ）アミノ酸の位置１８８におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置３３６におけるトリプトファン、ま

たは
（ｂ）アミノ酸の位置３３５におけるプロリン、
を単数または複数含み、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性である、組換え核酸分子。
【請求項６】
前記ヌクレオチド配列が、植物における発現のために設計された合成配列である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組換え核酸分子。
【請求項７】
前記ヌクレオチド配列が、植物細胞内でのヌクレオチド配列の発現を誘導可能なプロモーターに操作可能に連結する、請求項１～５のいずれか一項に記載の組換え核酸分子。
【請求項８】
前記ＨＰＰＤ阻害除草剤が、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド、Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項１に記載の組換え核酸分子。
【請求項９】
請求項１に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１０】
異種性のポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項９に記載のベクター。
【請求項１１】
請求項１に記載の組換え核酸分子を含む宿主細胞。
【請求項１２】
細菌宿主細胞である、請求項１１に記載の宿主細胞。
【請求項１３】
植物細胞である、請求項１１に記載の宿主細胞。
【請求項１４】
請求項１に記載の組換え核酸分子を含むトランスジェニック植物。
【請求項１５】
前記植物が、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、およびアブラナからなる群より選択される、請求項１４に記載の植物。
【請求項１６】
請求項１に記載の組換え核酸分子を含むトランスジェニック種子。
【請求項１７】
ＨＰＰＤ酵素を含む組換えポリペプチドであって、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性であり、前記ポリペプチドが配列番号１またはその断片に対して少なくとも５５％の配列同一性を有し、かつ以下のアミノ酸置換、

（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、グリシン、またはセリン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置１８９に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、システイン、またはアルギニン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、セリン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、またはグルタミン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリンまたはトリプトファン、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、アラニン、またはセリン、
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、アラニン、バリン、またはグルタミン酸、および
（ｇ）配列番号１のアミノ酸の位置２１５に対応するアミノ酸の位置におけるロイシン
を単数または複数含む、組換えポリペプチド。
【請求項１８】
前記アミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、または
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン

5

を単数または複数含む、請求項１７に記載の組換えポリペプチド。

【請求項１９】

前記アミノ酸配列が、配列番号３～５９のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する、請求項１８に記載の組換えポリペプチド。

【請求項２０】

ＨＰＰＤ酵素を含む組換えポリペプチドであって、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性であり、前記ポリペプチドが配列番号１に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその断片を含み、前記アミノ酸配列が以下のアミノ酸置換、

（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、

（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、または

（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

を単数または複数含む、組換えポリペプチド。

【請求項２１】

ＨＰＰＤ酵素を含む組換えポリペプチドであって、前記ＨＰＰＤ酵素がＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性であり、前記ポリペプチドが配列番号１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列またはその断片を含み、前記ＨＰＰＤが以下のアミノ酸置換、

（ａ）アミノ酸の位置１８８におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置３３６におけるトリプトファン、または

（ｂ）アミノ酸の位置３３５におけるプロリン、

を単数または複数含む、組換えポリペプチド。

【請求項２２】

前記ＨＰＰＤ阻害除草剤が、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド、Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項１７～２１のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項２３】

異種性のアミノ酸配をさらに含む、請求項１７～２１のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項２４】

ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性活性を有するポリペプチドを産生するための方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸分子が発現する条件下で、請求項１１に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項２５】

ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を植物に付与する方法であって、請求項１～８のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と操作可能に連結して植物細胞内での発現を駆動するプロモーターを含むＤＮＡコンストラクトによって、前記植物を形質転換する工程を含む方法。

【請求項２６】

そのゲノム内にＤＮＡコンストラクトが安定的に取り込まれた植物であって、前記コンストラクトが、請求項１～８のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と操作可能に連結したプロモーターを含む、植物。

【請求項２７】

前記植物が、植物細胞、植物組織、および植物種子からなる群より選択される、請求項２６に記載の植物。

【請求項２８】

前記植物が、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、およびアブラナからなる群より選択される、請求項２６に記載の植物。

【請求項２９】

検出可能な量の、請求項１～５のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項１７～２１のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含む商品。

【請求項３０】

請求項２６に記載の植物のトランスジェニック種子。

【請求項３１】

耕作地の雑草を防除する方法であって、請求項２６に記載の植物またはその種子を耕作地に植え付けること、および前記耕作地に有効濃度のＨＰＰＤ阻害除草剤を使用することを含む方法。

【請求項３２】

前記ＨＰＰＤ阻害除草剤が、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド、Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルト

7

リオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記植物が、グリホサートに対する耐性を付与するヌクレオチド配列およびグルホシネートに対する耐性を付与するヌクレオチド配列をさらに含む、請求項２６～２８のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項３４】

１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を植物に付与するための、請求項１～８のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列の使用。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【０００１】

本出願は、米国特許仮出願の、２０１２年9月１４日に提出された第６１／７０１，０３７号、２０１３年2月１８日に提出された第６１／７６６，０５７号、および２０１３年3月１５日に提出された第６１／７９０，４０４に対して優先権を主張するものであり、これらの内容はその全体が参照によって本明細書に取り込まれる。

【０００２】

電子提出された配列表への参照

配列表の正式原稿は、２０１３年9月１２日に作製された、ＡＳＣＩＩフォーマットによるサイズ２３７キロバイトの、ファイル名「２９１２９３９＿１９９７３ＷＯ０１＿ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔ」の配列表であり、これは明細書と同時にＥＦＳ－Ｗｅｂを通して提出された。このＡＳＣＩＩフォーマットによる文書に含まれる配列表は明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

【技術分野】

【０００３】

本発明は、植物分子生物学、特にＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性が改善された新規ＨＰＰＤポリペプチドに関する。

【背景技術】

【０００４】

４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）は、チロシン分解産物であるパラヒドロキシフェニルピルビン酸（本明細書ではＨＰＰと略称される）を、植物におけるトコフェロールおよびプラストキノンの前駆体であるホモゲンチジン酸（本明細書ではＨＧと略称される）へと転換する反応を触媒する酵素である（Ｃｒｏｕｃｈ Ｎ．Ｐ．ｅｔ ａｌ．（１９９７），Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，５３，２０，６９９３－７０１０，Ｆｒｉｔｚｅ ｅｔ ａｌ．（２００４），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ１３４：１３８８－１４００）。トコフェロールは、膜関連の抗酸化剤として作用する。

8

【０００５】

プラストキノンは、最初にＰＳＩＩとチトクロムｂ６／ｆ複合体との間で電子担体として作用し、次にカロテノイドの生合成に関わるフィトエンデサチュラーゼに対する酸化還元補因子となる。

【０００６】

現在までに、ＮＣＢＩデータベースに収載される様々な生物由来の１０００を超える核酸配列が、ＨＰＰＤドメインを有する推定上のタンパク質をコードするものとしてアノテートされてきた。しかしながらその多くは、ｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイまたは植物体への応用のいずれかにおいてタンパク質がＨＰＰＤ酵素活性を有することは証明されておらず、また、このようなＨＰＰＤタンパク質を植物に発現させた際に、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を獲得することも証明されていない。幾つかのＨＰＰＤタンパク質およびそれらの一次配列が当該技術分野において報告されているが、それらは特にシュードモナス属(Pseudomonas)（Ｒｕｅｔｓｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２０５，４５９－ ４６６，１９９２、国際公開第９６／３８５６７号）、コルディア属(Kordia)（国際公開第２０１１０７６８８９号）、シネココッカス属(Synechococcus)（国際公開第２０１１０７６８７７号）、およびロドコッカス属(Rhodococcus)（国際公開第２０１１０７６８９２号）のような細菌の、ブレファリズマ属(Blepharisma)（国際公開第２０１１０７６８８２号）のような原生生物の、ピクロフィルス属(Picrophilus)（国際公開第２０１１０７６８８５号）のようなユリ古細菌門の、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)（国際公開第９６／３８５６７号、ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）ＡＦ０４７８３４）、ニンジン（国際公開第９６／３８５６７号、ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）８７２５７）、エンバク(Avena sativa)（国際公開第０２／０４６３８７号、国際公開第１１／０６８５６７号）、コムギ（国際公開第０２／０４６３８７号）、メリケンニクキビ(Brachiaria platyphylla)（国際公開第０２／０４６３８７号）、シンクリノイガ(Cenchrus echinatus)（国際公開第０２／０４６３８７号）、ボウムギ(Lolium rigidum)（国際公開第０２／０４６３８７号）、オニウシノケグサ(Festuca arundinacea)（国際公開第０２／０４６３８７号）、アキノエノコログサ(Setaria faberi)（国際公開第０２／０４６３８７号）、オヒシバ(Eleusine indic)（国際公開第０２／０４６３８７号）、モロコシ属(Sorghum)（国際公開第０２／０４６３８７号、国際公開第１２／０２１７８５号）、トウモロコシ（国際公開第１２／０２１７８５号）のような植物の、コクシジオイデス属(Coccicoides)（ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）ＣＯＩＴＲＰ）の、オウレン(Coptis japonica)（国際公開第０６／１３２２７０号）の、コナミドリムシ(Chlamydomonas reinhardtii)（スペイン特許第２２７５３６５号）／国際公

9

開第２０１１／１４５０１５号の、またはマウスもしくはブタのような哺乳類のＨＰＰＤタンパク質である。

【０００７】

ＨＰＰＤの阻害によって光合成の脱共役および補助集光性色素の欠乏が誘導され、かつ最も重要なことには、通常はカロテノイドの作用である光防護が欠如するために、ＵＶ照射および活性酸素種によって葉緑素が破壊される（白化）（Ｎｏｒｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５），Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　７：２１３９－２１４９）。光合成の活発な組織での白化は、成長の阻害および植物の死をもたらす。

【０００８】

ＨＰＰＤへ特異的に結合することでこの酵素を阻害し、かつＨＰＰのホモゲンチジン酸への変換を阻害する幾つかの分子が、除草剤として非常に有効であることが証明されてきた。

【０００９】

現在最も多く市販されているＨＰＰＤ阻害除草剤は、以下の化学的分類のうちの一つに属している。

１）トリケトン類、例えばスルコトリオン［すなわち２－［２－クロロ－４－（メチルスルホニル）ベンゾイル］－１，３－シクロヘキサンジオン］、メソトリオン［すなわち２－［４－（メチルスルホニル）－２－ニトロベンゾイル］－１，３－シクロヘキサンジオン］、テンボトリオン［すなわち２－［２－クロロ－４－（メチルスルホニル）－３－［（２，２，２，－トリ－フルオロエトキシ）メチル］ベンゾイル］－１，３－シクロ－ヘキサンジオン］、テフリルトリオン［すなわち２－［２－クロロ－４－（メチルスルホニル）－３－［［（テトラヒドロ－２－フラニル）メトキシ］メチル］ベンゾイル］－１，３－シクロヘキサンジオン］］、ビシクロピロン［すなわち４－ヒドロキシ－３－［［２－［（２－メトキシエトキシ）メチル］－６－（トリフルオロメチル）－３－ピリジニル］カルボニル］ビシクロ［３．２．１］オクト－３－エン－２－オン］、ベンゾビシクロン［すなわち３－（２－クロロ－４－メシルベンゾイル）－２－フェニルチオビシクロ［３．２．１］オクト－２－エン－４－オン］。

２）ジケトニトリル類、例えば２－シアノ－３－シクロプロピル－１－（２－メチルスルホニル－４－トリフルオロメチルフェニル）－プロパン－１，３－ジオンおよび２－シアノ－１－［４－（メチルスルホニル）－２－トリフルオロメチルフェニル］－３－（１－メチルシクロプロピル）プロパン－１，３－ジオン。

３）イソキサゾール類、例えばイソキサフルトール［すなわち（５－シクロプロピル－４－イソオキサゾリル）［２－（メチルスルホニル）－４－（トリフルオロメチル）フェニル］メタノン］。植物において、イソキサフルトールは、ＨＰＰＤ阻害剤の特性を示すＤＫＮ、すなわちジケトニトリル化合物へと迅速に代謝される。

10

４）ピラゾリネート類、例えばトプラメゾン［すなわち［３－（４，５－ジヒドロ－３－イソオキサゾリル）－２－メチル－４－（メチルスルホニル）フェニル］（５－ヒドロキシ－１－メチル－１Ｈ－ピラゾール－４－イル）メタノン］、およびピラスルホトール［すなわち（５－ヒドロキシ－１，３－ジメチルピラゾール－４－イル（２－メシル－４－トリフルオロメチルフェニル）メタノン］、ピラゾフェン［すなわち２－［４－（２，４－ジクロロベンゾイル）－１，３－ジメチルピラゾール－５－イルオキシ］アセトフェノン］。

５）Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類（国際公開第２０１１／０３５８７４号）、および

６）Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類（国際公開第２０１２／０２８５７９号）。

【００１０】

これらのＨＰＰＤ阻害除草剤は、代謝耐性を示す農業植物、例えば内部でＨＰＰＤ阻害除草剤が迅速に分解されるトウモロコシ（Ｚｅａ　ｍａｙｓ）、米（Ｏｒｙｚａ　Ｓａｔｉｖａ）、およびコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）の耕作地における草および／または広葉雑草に対して用いることができる（Ｓｃｈｕｌｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３），ＦＥＢＳ　ｌｅｔｔｅｒｓ，３１８，１６２－１６６；Ｍｉｔｃｈｅｌｌ　ｅｔａｌ．（２００１），Ｐｅｓｔ　Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ　５７，１２０－１２８；Ｇａｒｃｉａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００），Ｂｉｏｃｈｅｍ．，３９，７５０１－７５０７；Ｐａｌｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００１），Ｐｅｓｔ　Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ　５７，１３３－１４２）。これらＨＰＰＤ阻害除草剤の使用範囲を拡大するため、植物、特に代謝耐性をもたないかまたは代謝耐性の低い植物に対して、農学分野の条件下で許容されるレベルの耐性を付与する幾つかの試みが為されてきた。

【００１１】

ＨＰＰＤを介したホモゲンチジン酸の産生を回避する試みに加え（米国特許第６，８１２，０１０号）、除草剤に関して十分な量の植物内の標的酵素が産生されるように、感受性の酵素を過剰発現することも行われてきた（国際公開第９６／３８５６７号）。ＨＰＰＤを過剰発現させることで、イソキサフルトール（ＩＦＴ）のジケトニトリル誘導体（ＤＫＮ）に対するより良い発芽前の耐性がもたらされたが、この耐性は発芽後の処理に対して十分なものではなかった（Ｍａｔｒｉｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００５），Ｐｅｓｔ　Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　６１：２６９－２７６）。

【００１２】

３番目の試みはＨＰＰＤを変異させることであり、この変異によって、ＨＰＰのホモゲンチジン酸への転換を触

11

媒する特性は保持しているが、変異前の天然ＨＰＰＤよりもＨＰＰＤ阻害剤に対する感受性の低い標的酵素が得られる。

【００１３】

この試みは、ジケトニトリルファミリーに属する二つのＨＰＰＤ阻害除草剤（国際公開第９９／２４５８５号）である２－シアノ－３－シクロプロピル－１－（２－メチルスルホニル－４－トリフルオロメチルフェニル）－プロパン－１，３－ジオンおよび２－シアノ－１－［４－（メチルスルホニル）－２－トリフルオロメチルフェニル］－３－（１－メチルシクロプロピル）プロパン－１，３－ジオンに対して耐性のある植物の産生に成功した（欧州特許第４９６６３０号）。Ｐｒｏ２１５Ｌｅｕ、Ｇｌｙ３３６Ｇｌｕ、Ｇｌｙ３３６Ｉｌｅ、そして特にＧｌｙ３３６Ｔｒｐ（変異アミノ酸の位置はシュードモナスＨＰＰＤへの参照により示す）は、これらのジケトニトリル除草剤による処理に対する耐性が増大した変異として同定された。

【００１４】

さらに最近では、タバコおよび大豆の色素体ゲノムへのシュードモナスＨＰＰＤ遺伝子の導入によって、発芽後にイソキサフルトールを適用した際の耐性が、核の形質転換よりも効果的に付与されることが示された（Ｄｕｆｏｕｒｍａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．（２００７），Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．５（１）：１１８－３３）。

【００１５】

国際公開第０４／０２４９２８号では、発明者らが、植物細胞内へのＨＰＰ前駆体の流量を増大させることで、これらの植物細胞におけるプレニルキノンの生合成（例えばプラストキノン類、トコフェロール類の合成）を増大させることを考えた。このことは、ＰＤＨ酵素の過剰発現により、前記前駆体の合成を「シキミ酸」経路へ関係させることによって為された。彼らはまた、ＰＤＨ酵素をコードする遺伝子およびＨＰＰＤ酵素をコードする遺伝子による植物の形質転換によって前記植物のＨＰＰＤ阻害剤への耐性の増大が可能となることにも注目した。

【００１６】

特許出願の国際公開第２００９／１４４０７９号には、蛍光菌ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）タンパク質の位置３３６に特異的な変異を有する、ＨＰＰＤをコードする核酸配列、およびＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性である植物を得るためのその使用について開示されている。

【００１７】

国際公開第２００２／０４６３８７号では、様々なＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性の付与に関連する可能性のある、植物に由来するＨＰＰＤタンパク質の幾つかのドメインが同定されたが、記載されたドメイン機能の影響

12

を裏付ける植物体におけるデータ、また生化学的データのいずれも示されていない。

【００１８】

国際公開第２００８／１５０４７３号では、ＨＰＰＤ阻害除草剤への耐性を改善する二つの異なる耐性機構、すなわち変異ＨＰＰＤ酵素をコードする改変エンバク遺伝子と、ＣＹＰ４５０トウモロコシモノオキシゲナーゼ（ｎｓｆ １遺伝子）との組み合わせが例示されているが、両タンパク質の組み合わせに基づく相乗的効果を示すデータは開示されていない。

【００１９】

さらに米国特許第２０１１０１７３７１８号では、例えばエンバクに由来する耐性ＨＰＰＤをコードする遺伝子のみではなく、ＨＳＴ（ホモゲンチジン酸ソラネシルトランスフェラーゼ（ｈｏｍｏｇｅｎｔｉｓａｔｅ ｓｏｌａｎｅｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ））タンパク質をコードする幾つかの植物遺伝子を組み合わせた過剰発現による、ＨＰＰＤ阻害剤に耐性の植物を産生する方法について開示されている。しかしながら、選択された数種のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性のレベルはどちらかといえば限られたものであった。

【００２０】

国際公開第２０１１０９４１９９号および米国特許第２０１１０１８５４４４号では、野生型大豆の数百株について、ＨＰＰＤ阻害剤であるイソキサフルトールに対する耐性を評価した。わずかな数株が、除草剤に対する妥当なレベルの耐性を示した。耐性に関与する推定上のＱＴＬ（ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｔｒａｉｔ ｌｏｃｉ：量的形質遺伝子座）が同定された。ゲノムのこの領域では、ＡＢＣ輸送体をコードする遺伝子が、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性の改善が観察される主要な形質として同定された。しかしながら、同定された遺伝子を発現するトランスジェニック植物において、試験したＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性は改善されなかった。

【００２１】

国際公開第２０１０／０８５７０５号では、エンバクＨＰＰＤの幾つかの変異体(mutants)が開示されている。幾つかの変異形(variants)では、トリケトンである「メソトリオン」に対するｉｎ ｖｉｔｒｏでの耐性の改善が示されたが、タバコ植物ではわずかな数個の変異体しか発現されなかった。加えて、これらの変異体を発現するタバコ植物のいずれも、野生型エンバクＨＰＰＤ遺伝子を発現するタバコ植物に比較して、メソトリオンまたはイソキサフルトールに対する耐性の改善を示さなかった。

【００２２】

米国特許第２０１２／００４２４１３号には、ＨＰＰＤ活性を有するが、少なくとも１のＨＰＰＤ阻害剤に対して幾らか非感受性であるポリペプチドについて記載されている。

13

さらに、ＨＰＰＤ酵素の異なる位置におけるある一組の変異について示唆されており、最終的には、このような変異ＨＰＰＤをわずかに含む植物の生化学データおよび耐性レベルについても開示されている。

【００２３】

欧州特許第２１４５３０１２号には、幾つかのＨＰＰＤ変異体について記載されているが、記載された変異体は、植物体において数種のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性の改善を示さなかった。

【発明の概要】

【００２４】

ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を付与する組成物および方法が提供される。組成物には、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性のＨＰＰＤポリペプチド、このようなポリペプチドをコードする単離された、組換えまたはキメラ核酸分子、ならびにこれらの核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞が包含される。また、組成物にはこれらのポリペプチドに対する抗体も包含される。ヌクレオチド配列は、微生物および植物を含む生物の形質転換および該生物における発現のためのＤＮＡコンストラクトまたは発現カセット内に用いることができる。ヌクレオチド配列は、微生物および植物を含むが、これらに限定されない生物における発現のために設計された合成配列であってもよい。

【００２５】

組成物は除草剤に耐性のポリペプチドをコードする核酸分子を包含し、配列番号１のアミノ酸の位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および３４０に対応する位置に１以上のアミノ酸置換を有するＨＰＰＤタンパク質をコードする核酸分子を包含し、配列番号１のアミノ酸の位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および３４０に対応する位置に１以上のアミノ酸置換が導入された、配列番号１、２、６３、６４，または６５のいずれかに示されるＨＰＰＤタンパク質を包含し、かつ配列番号３～５９のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列、ならびにそれらの変異形および断片を包含する。本発明にはさらに、該核酸分子によってコードされる除草剤に耐性のＨＰＰＤタンパク質が含まれ、および該ＨＰＰＤタンパク質を含む組成物も含まれる。

【００２６】

組成物はまた、本発明の核酸配列を細菌、植物、植物細胞、組織、および種子のゲノム内に導入することによって形質転換された、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性の細菌、植物、植物細胞、組織、および種子も含む。該生物が植物の場合、該配列の導入によって、植物にＨＰＰＤ阻害除草剤を適用した際には、形質転換された生物ではなく、ＨＰＰＤ阻害剤に感受性の雑草またはその他の非形質転換植物が選択的に死滅する。該配列はさらに、１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤の存在下で成長する植物細

14

胞を選択するためのマーカーとしても使用できる。

【００２７】

さらに、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性活性を利用してＨＰＰＤ酵素を同定する方法も提供される。

【００２８】

本発明の組成物および方法は、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性が増強された生物の産生に有用である。これらの生物、および該生物を含む組成物は、農業用に望ましいものである。本発明の核酸配列を含む植物または種子は、植物産物を得るために耕作地で成長かつ収穫可能である。本発明の組成物は、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性活性を有する改変または改善されたタンパク質を産生するために、または、産物または生物におけるＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性のタンパク質もしくは核酸の存在を検出するためにも有用である。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１】蛍光菌(Pseudomonas fluorescens)（配列番号１）、エンバク(Avena sativa)（配列番号６３）、エンバクに由来するＨＰＰＤの変異形（配列番号６４）、トウモロコシ(Zea mays)（配列番号６５）、ストレプトマイセス・アベルミティリス(Streptomyces avermitilis)（配列番号６９）、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)（配列番号６６）、オオムギ(Hordeum vulgare)（配列番号６７）、ニンジン(Daucus carota)（配列番号６８）、コムギ葉枯病菌(Mycosphaerella graminicola)（配列番号７０）、およびコクシジオイデス・イミティス(Coccicoides immitis)（配列番号７１）を含む微生物ならびに植物種に由来するＨＰＰＤのアミノ酸配列のアラインメントを示した図である。

【発明の具体的説明】

【００３０】

以下、すべてではないが幾つかの本発明の実施形態が示された添付の図面への参照により、本発明の全体をさらに記載する。実際に、これらの発明は多くの異なる形態で具体化され得るものであるから、本明細書に示す実施形態に限定されるように解釈されるべきではない。むしろこれらの実施形態はこの開示が法的要件を十分に満たすように提供されるものである。同様の番号は一貫して同様の要素を指す。

【００３１】

これらの発明に関わり、前述の記載および添付の図面中の教示の利益を享受する当業者は、本明細書に示される、本発明の多くの改変およびその他の実施形態を思いつくであろう。したがって、本発明は開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、改変、およびその他の実施形態は、添付の請求項の範囲内に包含されることを意図することが理解されるべきである。本明細書では特定の用語を採用しているが、これらは限定目的ではなく、一般的かつ説明的な意味でのみ用いられるものであ

15

る。

【００３２】

概要

植物に対し、広範囲のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する農学的に許容されるレベルの耐性を付与する幾つかの試みが為されてきた。これらの試みには、ＨＰＰＤを介したホモゲンチジン酸の産生を回避すること（米国特許第６，８１２，０１０号）、除草剤に関して十分な量の植物内の標的酵素が産生されるように、感受性の酵素を過剰発現すること（国際公開第９６／３８５６７号）、およびＨＰＰＤを変異させることであり、この変異によって、ＨＰＰのホモゲンチジン酸への転換を触媒する特性は保持しているが、変異前の天然ＨＰＰＤよりもＨＰＰＤ阻害剤に対する感受性の低い標的酵素を得ることが含まれる。

【００３３】

上記の数種のＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性を示す植物の開発が成功したにも関わらず、新規の、または幾つかの異なるＨＰＰＤ阻害剤、特にトリケトン類（例えばスルコトリオン、メソトリオン、テンボトリオン、ベンゾビシクロン、およびビシクロピロン）、ピラゾリネート類（例えばトプラメゾンおよびピラスルホトール）、Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類（国際公開第２０１１／０３５８７４号）、およびＮ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類（国際公開第２０１２／０２８５７９号）の分類に属するＨＰＰＤ阻害剤に対する、植物における耐性の発現および／または改善がなお必要とされている。

【００３４】

このように本発明は、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を制御するための改善された組成物および方法を提供する。Ｎ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンに分類され得る、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールに分類され得る、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるピラゾリネート類に分類され得るＨＰＰＤ阻害除草剤は、経済的に重要な単子葉類および双子葉類の一年生有害植物の広範なスペクトルに対して顕著な除草

16

活性を有する。これらの活性物質は、根茎、貯蔵木材、またはその他の多年生器官からシュートを形成し、かつ防除が困難な多年生有害植物に対しても有効に作用する。本発明による意味の範囲において、「除草剤」は、それ自体で除草活性物質となるか、またはその有効性を変化させる添加物、例えばその活性を増大させる薬剤（相乗的薬剤）またはその活性を制限する薬剤（毒性緩和剤）と併用して用いる物質として理解される。除草剤は、固体もしくは液体補助剤または製剤技術において通常用いられる担体（例えば天然または再生鉱物性物質、溶媒、分散剤、湿潤剤、粘着付与剤、乳化剤、成長促進剤など）、および１以上のさらなる除草剤および／または１以上の駆除剤（例えば殺虫剤、抗ウイルス剤、殺菌剤、抗アメーバ剤、駆除剤、抗真菌剤、殺菌剤、抗線虫剤、軟体動物駆除剤など）をさらに含んでもよい。

【００３５】

本方法は、本発明のＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子をコードするヌクレオチド配列によって生物を形質転換すること、またはこのようなＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子を、それを有していない生物に導入すること（例えば交配、細胞融合、または導入された本発明のＨＰＰＤ阻害剤に対する遺伝子を含む生物と、それを含まない生物とを交雑して、そのような遺伝子を含む子孫を得ることによって）に関与する。本発明のヌクレオチド配列は、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性、特にＮ－（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性が増大した植物を作製するために有用である。本発明のＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子はまた、「クマロン誘導体除草剤」に対しても耐性を示し得る（国際公開第２００９／０９０４０１号、国際公開第２００９／０９０４０２号、国際公開第２００８／０７１９１８号、国際公開第２００８／００９９０８号に記載されている）。これに関して、本発明のＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子のうちのいずれか一つは、国際公開第２０１１／１４５０１５号、国際公開第２０１３／０６４９８７号、国際公開第２０１３／０６４９６４号、

17

または国際公開第２０１０／０２９３１１号に記載される、ホモゲンチジン酸ソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ：ｈｏｍｏｇｅｎｔｉｓａｔｅ ｓｏｌａｎｅｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）阻害除草剤に耐性の植物を得るためにキメラＨＳＴ遺伝子または変異ＨＳＴ遺伝子を発現させた植物に、さらに発現させることができる。本明細書で用いられる「クマロン誘導体除草剤」または「ＨＳＴ阻害除草剤」は、ＩＵＰＡＣ命名法による化合物、５Ｈ－チオピラノ［４，３－ｂ］ピリジン－８－オール、５Ｈ－チオピラノ［３，４－ｂ］ピラジン－８－オール、オキサチイノ［５，６－ｂ］ピリジン－４－オール、およびオキサチイノ［５、６－ｂ］ピラジン－４－オールを包含する。

【００３６】

このように、本発明の「ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性」遺伝子は、細胞または生物に発現させた際、これを発現しない細胞または生物よりも高濃度のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性が付与されるタンパク質、または特定の濃度のＨＰＰＤ阻害除草剤に対して、これを発現しない細胞または生物よりも長時間耐性となるタンパク質、またはこれを発現しない細胞または生物よりも、損傷または成長阻害が少ない状態で光合成、成長、および／または再生を行う能力が付与されるタンパク質をコードする遺伝子を意図する。「ＨＰＰＤ阻害剤耐性タンパク質」は、細胞または生物に、これを発現しない細胞または生物よりも高濃度のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性が付与されるタンパク質、または特定の濃度のＨＰＰＤ阻害除草剤に対して、これを発現しない細胞または生物よりも長時間耐性となるタンパク質、またはこれを発現しない細胞または生物よりも、損傷または成長阻害が少ない状態で光合成、成長、および／または再生を行う能力が付与されるタンパク質を包含する。「耐性がある」または「耐性」は、特定のＨＰＰＤ阻害除草剤の存在下で生存すること、または光合成、タンパク質合成、または呼吸、および再生のような必須の細胞機能を、無処理の細胞または生物と容易に識別できないほどに遂行する能力、または植物をＨＰＰＤ阻害除草剤で処理した際、このような除草剤で処理していない（しかしＨＰＰＤ阻害除草剤の使用以外の機序、例えばその全体が参照によって本明細書に取り込まれる国際公開第２０１１／１００３０２号に記載される方法によって雑草が除去されたかまたは抑制された場合の）植物と比較して収穫に有意差がみられないかまたは収穫が改善される能力を意図する。

【００３７】

本発明のＨＰＰＤ核酸配列は、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性を細胞に付与する活性に加え、ＨＰＰＤ活性、すなわちパラヒドロキシフェニルピルビン酸（ｐＨＰＰ）をホモゲンチジン酸へ変換する反応を触媒する活性を有するポリペプチドをコードする。選択的に、ｉｎ ｖｉｔｒｏで試験した際の本発明のＨＰＰＤタンパク質による触媒活性は、同一条件下で、かつ上記のＨＰＰＤ阻害除草剤の非存在下で、参照ＨＰＰＤタンパク質による触媒活性の９０％を超えて、７０％を超えて、または５０％を超えて同様である。幾つかの実施形態によれば、該触媒活性は、参照ＨＰＰＤタンパク質に比較して改善される。ＨＰＰＤ酵素の触媒活性は、当該技術分野において公知の様々な方法によって定義され得る。

国際公開第２００９／１４４０７９号には、適した様々なスクリーニング法について記載されている。

【００３８】

ＨＰＰＤ阻害除草剤に対して増強された耐性を示すＨＰＰＤ酵素は、参照ＨＰＰＤに比較した際、以下によって耐性の増強を示し得る。ａ）天然基質である４－ヒドロキシフェニルピルビン酸に対する高いK_m値、ｂ）４－ヒドロキシフェニルピルビン酸をホモゲンチジン酸への変換に対する低いｋｃａｔ値、ｃ）酵素：ＨＰＰＤ阻害除草剤複合体の形成を左右する速度定数であるｋｏｎ値の低下、ｄ）酵素：ＨＰＰＤ阻害除草剤複合体の解離を左右する速度定数であるｋｏｆｆ値の増大、および／またはｅ）ｃ）およびｄ）のうちの一つまたは両方が変化した結果としての、酵素：ＨＰＰＤ阻害除草剤複合体の解離を左右する平衡定数K_i（K_dとも称される）値の増大。

【００３９】

ＨＰＰＤタンパク質の酵素活性は、ＨＰＰまたはO_2基質の量の減少の測定、または酵素反応に由来するいずれかの産物、すなわちホモゲンチジン酸またはCO_2の蓄積の測定のどちらかを可能にするいずれかの方法によって測定できる。ＨＰＰＤ活性は特に、参照により本明細書に取り込まれる国際公開第２００９／１４４０７９号、Ｇａｒｃｉａ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１１９，１５０７－１５１６、または国際公開第２０１２／０２１７８５号に記載される方法によって測定することができる。

【００４０】

本発明の目的のための「参照」ＨＰＰＤタンパク質（またはＨＰＰＤ遺伝子）とは、それに対して本発明のＨＰＰＤタンパク質またはＨＰＰＤ核酸が比較される、いずれかのＨＰＰＤタンパク質または核酸である。参照ＨＰＰＤは、天然の植物、細菌、または動物のＨＰＰＤであってよいか、または当該技術分野において公知の変異ＨＰＰＤであってもよい。このような参照ＨＰＰＤは、本発明のＨＰＰＤタンパク質または核酸が、特に関心のある特性（例えば改善された、同程度の、または減少したＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性またはＨＰＰＤ酵素活性、改善された、同程度の、または減少した宿主細胞における発現、改善された、同程度の、または減少したタンパク質安定度など）を有するか否かを決定するために用いることができる。

19

【００４１】
本明細書の様々な実施形態によれば、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性の核酸（その単離された、組換えおよびキメラ遺伝子、該核酸を含むベクター、宿主細胞、植物、植物の部分、および種子、該核酸によってコードされるＨＰＰＤポリペプチドおよびその組成物、ならびに植物のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を増大させるため、特にＮ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を増大させるための該核酸の使用方法を含む）は、２、３、４、５、６、または７アミノ酸置換を含む１以上のアミノ酸置換を、配列番号１のアミノ酸の位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および／または３４０に対応する位置に含むように改変されたＨＰＰＤタンパク質をコードする。「対応する」は、本明細書の他所に記載する標準的なアラインメントアルゴリズムを用いて二つの（またはそれを超える）配列を整列させた際の、配列番号１の位置に関連するヌクレオチドまたはアミノ酸の位置を意図する。様々な微生物および植物種に由来するＨＰＰＤアミノ酸配列を用いた、配列番号１の代表的なアラインメントを図１に示す。例えば、配列番号１のアミノ酸の位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および３４０は、それぞれ、エンバク由来のＨＰＰＤ（配列番号６３）のアミノ酸の位置２４１、２４２、２７１、４１２、４１３、４１６、および４１７に対応し、それぞれ、オオムギ由来のＨＰＰＤ（配列番号６７）のアミノ酸の位置２３５、２３６、２６５、４０６、４０７、４１０、および４１１に対応し、かつ、それぞれ、トウモロコシ由来のＨＰＰＤ（配列番号６５）のアミノ酸の位置２４２、２４３、２７２、４１３、４１４、４１７、および４１８に対応する。したがって、配列番号１の配列よりも多いかまたは少ない残基を有する、関連するＨＰＰＤアミノ酸配列の長さに依存して、関連するＨＰＰＤタンパク質において対応する位置は、位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および３４０とは異なる位置であってよい。

20

【００４２】
一実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、グリシン、またはセリン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置１８９に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、システイン、またはアルギニン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、セリン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、またはグルタミン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリンまたはトリプトファン、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、アラニン、またはセリン、
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、アラニン、バリン、またはグルタミン酸、および
（ｇ）配列番号１のアミノ酸の位置２１５に対応するアミノ酸の位置におけるロイシン
からなる群より選択される、１以上のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４３】
別の実施形態によれば、ＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１

21

のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４４】
特定の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号１として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有し、ここで該ＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４５】
別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号１として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％，または少なくとも９９％の配列同一性を有し、ここで前記ＨＰＰＤは、
（ａ）アミノ酸の位置１８８におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置３３６におけるトリプトファン、または
（ｂ）アミノ酸の位置３３５におけるプロリン
のアミノ酸置換を含む。
【００４６】
さらに別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号６３として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有し、ここで該ＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するア

22

23

ミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４７】
さらに別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号６４として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有し、ここで該ＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４８】
さらに別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号６５として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有し、ここで該ＨＰＰＤは、

24

（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。
【００４９】
別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５７として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号６０として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するア

25

ミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【００５０】

別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５８として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号６１として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するア

26

ミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【００５１】

別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５９として示すアミノ酸配列に対して少なくとも５３％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号６２として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するア

27

ミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【００５２】

別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号１として示すアミノ酸配列に対して少なくとも８５％の配列同一性を有し、ここで該ＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸

28

の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換を含むように改変された。

【００５３】

別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号１として示すアミノ酸配列に対して少なくとも８５％の配列同一性を有し、ここで前記ＨＰＰＤは、
（ａ）アミノ酸の位置１８８におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置３３６におけるトリプトファン、または
（ｂ）アミノ酸の位置３３５におけるプロリン
のアミノ酸置換を含む。

【００５４】

別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５７として示すアミノ酸配列に対して少なくとも８５％の配列同一性を有する。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプ

29

トファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。
【００５５】
別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５８として示すアミノ酸配列に対して少なくとも８５％の配列同一性を有する。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。
【００５６】
別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、本明細書に配列番号５９として示すアミノ酸配列に対して少なくとも８５％の配列同一性を有する。本実施形態のＨＰＰＤは、
（ａ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置における

30

トリプトファン、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、
（ｃ）配列番号１のアミノ酸の位置１８８に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、
（ｄ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、
（ｅ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号１のアミノ酸の位置３３６に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号１のアミノ酸の位置３３９に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号１のアミノ酸の位置３４０に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または
（ｆ）配列番号１のアミノ酸の位置３３５に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン
のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。
いずれのＨＰＰＤ配列も、本明細書に開示される置換の１以上を含むように改変されてよい。例えば本発明のＨＰＰＤは、上に記載した置換の１以上を含むように改変された、自然に存在する細菌、植物、または動物のＨＰＰＤ酵素のいずれも包含する。
【００５７】
本発明のＨＰＰＤタンパク質を得るために、現存するタンパク質からの出発アミノ酸配列は、本出願において定義されるように、少なくとも１のアミノ酸を用いた人の手による置換で改変される必要があるが、これは、別のアミノ酸をコードする別のコドンを用いて特定のコドンを置換することでこのようなタンパク質をコードするＤＮＡを改変することにより、最も便利に行われる。
【００５８】
本発明に従って改変されてよい代表的なＨＰＰＤ配列としては、細菌、例えば蛍光菌(Pseudomonas fluorescens)のようなシュードモナス種(Pseudomonas sp.)、またその他には、シネコシスティス(Synechocystis)属のシアノバクテリアに由来するＨＰＰＤ配列が挙げられる。該配列はまた、植物、特に双子葉類植物、セリ科植物、またその他には、単子葉類植物に由来してもよい。引用してもよい有利な例としては、タバコ、シロイヌナズナ属、ニンジン、トウモロコシ（Ｚｅａ　ｍａｙｓまたはｃ

31

ｏｒｎ）、コムギ、オオムギ、エンバク、メリケンニクキビ、シンクリノイガ、ボウムギ、オニウシノケグサ、アキノエノコログサ、オヒシバ、モロコシ属、シンクリノイガ、オニウシノケグサのような植物が挙げられる。コード配列およびそれらを単離してクローニングする方法は当該技術分野において公知であるか、または本明細書の他所に記載している（例えば配列番号６３～７６）。本発明の特定の実施形態によれば、本発明に従って改変されてよいＨＰＰＤは、細菌由来、詳細にはシュードモナス種、さらに詳細には蛍光菌、ロドコッカス種、ベニミズケムシ、シネココッカス種、ピクロフィルス・トリダス、コルディア・アルジシダ由来であるか、またはシロイヌナズナ、モロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ボウムギ、およびエンバクのような植物由来である。

【００５９】

本発明の目的のために、本発明のＨＰＰＤはさらに改変されてよく、例えばクローニング目的や輸送ペプチドとの融合などのために、幾つかのアミノ酸（例えば１ないし１０アミノ酸）が置換され、付加され、または欠失していてもよく、この場合ＨＰＰＤ活性、すなわちパラヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への変換を触媒する特性が保持されているか、またはさらに改善されたＨＰＰＤとなっていてもよい。例えば本明細書に記載する、改変によってさらに改善されたＨＰＰＤは、配列番号２として示される蛍光菌由来の変異ＨＰＰＤ、配列番号６４として示されるエンバク由来の変異ＨＰＰＤ、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第２０１２／０２１７８５号の配列番号３～３２６、３８３～３８９、３９３、３９５、および３９７～４５９のいずれかに示される変異ＨＰＰＤ配列、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第２０１１／０６８５６７号の配列番号２～１４および２０～５０のいずれかに示されるＨＰＰＤ配列、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第２０１０／０８５７０５号の配列番号１５～２６のいずれかに示されるＨＰＰＤ配列、それぞれにその全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第号０９／１４４０７９または米国特許第６，２４５，９６８号に記載される、１以上の置換を有するＨＰＰＤ、国際公開第２０１０／０８５７０５号の表１、２、５，または６に記載される、１以上の置換を有するＨＰＰＤ、および／または国際公開第２０１１／０６８５６７号の表１に記載される、１以上の置換を有するＨＰＰＤであってよい。

【００６０】

幾つかの実施形態によれば、本発明のヌクレオチド配列（その単離された、組換えおよびキメラ遺伝子、該核酸配列を含むベクター、宿主細胞、植物、植物の部分、および種子、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列およびその組成物、ならびに植物のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を増大させるため、特にＮ（１，２，５

32

－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類の分類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を増大させるための該核酸配列の使用方法を含む）は、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性のポリペプチドをコードする配列番号３～５９のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、ならびにその断片および変異形をコードする。このように本実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を宿主細胞に付与する、配列番号３～５９のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、ならびにその断片および変異形を含む。

【００６１】

Ａ．ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性の測定方法

本発明のＨＰＰＤ配列を評価するため、いずれかの適切な、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性の測定方法を用いることができる。耐性は、細胞または生物が特定のＨＰＰＤ阻害除草剤の存在下で生存すること、またはこれらが光合成、タンパク質合成、または呼吸、および再生のような必須の細胞機能を、無処理の細胞または生物と容易に識別できないほどに遂行する能力、または植物をＨＰＰＤ阻害除草剤で処理した際、このような除草剤で処理していない（しかしＨＰＰＤ阻害除草剤の使用以外の機序によって雑草が除去されたかまたは抑制された場合の）植物と比較して収穫に有意差がみられないかまたは収穫が改善される能力をモニターすることによって測定できる。幾つかの実施形態によれば、耐性は、それぞれのＨＰＰＤタンパク質をコードする遺伝子を含む核酸によって形質転換された細胞または生物の、明らかな指標となる表現型に従って測定できるか、または異なる濃度の様々なＨＰＰＤ阻害剤の存在下におけるＨＰＰＤタンパク質のｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイによって測定できる。用量反応、およびこれらの指標となる表現型（茶色の形成、成長阻害、白化、除草効果など）に付随する、用量反応における相対的なシフトは、例えばＧＲ５０（成長を５０％減少させる濃度）またはＭＩＣ（最小発育阻止濃度）値に関連して便利に出現し、ここで値の増加は、除草剤の異なる濃度範囲における植物の損傷、成長点の白化症状などに基づいた通常の様式において、発現したＨ

33

ＰＰＤに固有の耐性の増大に対応する。これらのデータは、例えばｘ軸にプロットされた「用量」およびｙ軸にプロットされた「死滅パーセンテージ」、「除草効果」、「緑色植物の出現数」などを有する用量／反応曲線に由来するＧＲ５０値に関連して表現することができ、ここでＧＲ５０値の増大は、発現したＨＰＰＤに固有の耐性の、レベルの増大に対応する。除草剤は、発芽前または発芽後に、適切に使用することができる。

【００６２】

様々な実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤタンパク質をコードする核酸または遺伝子または本発明のＨＰＰＤタンパク質の耐性レベルは、タバコのような試験植物または大豆または綿のような農業植物の遺伝子組換え、再生、育種、およびスプレー試験を通してスクリーニングすることができる。このようなスクリーニングによって得られた結果に従って、このような植物は、ＨＰＰＤ阻害剤（例えば、Ｎ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤）に対し、ＨＰＰＤタンパク質をコードするいずれの外因性遺伝子も含まないような植物よりも、または本発明のＨＰＰＤタンパク質をコードする核酸と同一のプロモーターによって制御される、参照ＨＰＰＤをコードするＤＮＡ、例えばシロイヌナズナＨＰＰＤをコードするＤＮＡを含む遺伝子を含む植物よりもさらに耐性であり、望ましくは耕作地への適用に推奨される通常用量の少なくとも２倍の量に対して耐性であり、さらに好ましくは耕作地への適用に推奨される通常用量の４倍までの量に対して耐性である。したがって、用語「ＨＰＰＤに作用する少なくとも１の除草剤に対する植物の耐性を増大させられる」は、本発明のＨＰＰＤを発現する植物による、ＨＰＰＤ阻害除草剤の耕作地での通常用量の少なくとも２×、または３×、または４×、またはそれを超える量に対する、内在性ＨＰＰＤのみを発現する植物または参照ＨＰＰＤ酵素を発現する植物に比較した耐性を意味する。これに関して、用語「ＨＰＰＤに作用する除草剤」は、公知の物質および／または除草剤として使用される物質に限定されず、ＨＰＰＤタンパク質の触媒活性を阻害するいずれの物質も指す。

34

【００６３】

あるいは本発明のＨＰＰＤタンパク質に対して、pI_{50}（pI_{50}値は、モル濃度における酵素活性の５０％を阻害するために必要な阻害剤の濃度のｌｏｇ値を意味する）のような定量レベルでのデータを得て、いずれかのＨＰＰＤ阻害除草剤それぞれの存在下または非存在下で、参照ＨＰＰＤ配列と比較することができる。

【００６４】

限定はされないが、本発明のＨＰＰＤ配列を評価するために用いることのできる特定のアッセイの種類は、比色アッセイである。このアッセイでは、１％アガロース、５ｍＭ　Ｌ－チロシン、および４２ｍＭ　コハク酸塩を含み、かつベクターｐＳＥ４２０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カールスルーエ、独国）または改変型ｐＳＥ４２０（ｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ）のための選択薬剤を含むＹＴブロス型の培地を、深底ウェルプレートに注ぎ込む。指数関数増殖期にある、ベクターｐＳＥ４２０－ＨＰＰＤｘ（ＨＰＰＤｘは、推定上のＨＰＰＤ酵素／タンパク質をコードするいずれかの遺伝子を意味する）を含む大腸菌培養液を各ウェル内に入れる。３７℃にて１６時間後、培地を含まないウェル、空のベクターｐＳＥ４２０を含む大腸菌培養液をまいたウェルは透明であり、また、不活性のＨＰＰＤをコードする遺伝子を含むベクターｐＳＥ４２０－ＨＰＰＤｘを含む大腸菌培養液をまいたウェルも透明であるが、活性のあるＨＰＰＤをコードするベクターｐＳＥ４２０－ＨＰＰＤｘを含む大腸菌培養液まいたウェルは茶色である。この活性が何に由来するかに関わらず、本試験はＨＰＰＤ活性を反映するものであり、かつＨＰＰＤ活性の同定を定性的レベルで可能にすることがこれまでに示されてきた（米国特許第６，７６８，０４４号）。

【００６５】

Ｂ．ＨＰＰＤ配列への変異の導入方法

本発明の核酸によってコードされる変異ＨＰＰＤタンパク質では、上で定義したように、少なくとも１のアミノ酸が置換されている。

【００６６】

置換は上で定義したように、参照ＨＰＰＤをコードする核酸配列において、置換に適したいずれかの方法によって行うことができ、前記配列では、置換されるアミノ酸をコードするコドンが置換するアミノ酸に対応するコドンによって置換され、前記コドンは広く文献に記載され、かつ当業者に周知である。

【００６７】

この置換を行うため、幾つかの分子生物学的方法を用いることができる。本発明の変異核酸配列および対応するタンパク質の調製に有用な方法は、予め選択した１以上のアミノ酸をコードするコドンに対して部位特異的な変異誘発を行うことを含む。このような部位特異的変異を

35

得るための方法は当業者に周知であり、かつ広く文献に記載されている（特に、Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，１９９１，Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｍ．Ｊ．ＭｃＰＨＥＲＳＯＮ，ＩＲＬ ＰＲＥＳＳ）。また、該方法は市販のキットを用いて行うこともできる（例えばＱｉａｇｅｎから市販される、ＱＵＩＫＣＨＡＮＧＥ（商標）ｌｉｇｈｔｅｎｉｎｇ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｋｉｔ）。部位特異的変異誘発を行った後、適切なスクリーニングの補助を用いてＨＰＰＤ阻害剤に対する感受性の低い変異ＨＰＰＤを含む細胞を選択することが有用である。これを達成するための適切なスクリーニング方法は上記のとおりである。

【００６８】

あるいは、参照ＨＰＰＤをコードするＤＮＡ配列は、本明細書で説明する置換の１以上を有するＨＰＰＤタンパク質をコードするようにコンピュータ上で改変した後、新規合成してもよい。変異ＨＰＰＤタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、本明細書の他所に記載するように、宿主細胞内へ導入してもよい。

【００６９】

Ａ．単離されたポリヌクレオチドならびにその変異形および断片

幾つかの実施形態によれば、本発明は、単離された、または組換えたポリヌクレオチドを含む。本明細書で定義される「単離された」もしくは「組換え」ポリヌクレオチドまたはポリペプチド／タンパク質、またはその生物学的活性部分は、それらが異種性の宿主細胞内、またはトランスジェニック植物細胞、種子、または植物内に含まれる際には、既に元の天然状態の生物として存在するのではない。一実施形態によれば、「単離された」ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムＤＮＡ内の核酸（すなわち核酸の５’および３’末端に位置する配列）に当然隣接する配列（例えば、タンパク質をコードする、または調節性の配列）を含まない。用語「組換え」は、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを操作した、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを包含し、このようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは天然のものとは（例えば化学組成または構造において）異なっている。別の実施形態によれば、「単離された」または「組換え」ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムＤＮＡ内に当然に存在する内部配列（すなわちイントロン）を含まない。このようなポリヌクレオチドの典型例は、いわゆる相補性ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）である。例えば様々な実施形態によれば、単離されたＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性をコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する細胞のゲノムＤＮＡ内のポリヌクレオチドに当然に隣接するヌクレオチド配列よりも、約５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂよりも短いヌクレオチド配列を含み得る。本発明の核酸分子は、本発明のＨＰＰＤコードする核酸分子、例えば配列番号６０～６２のいずれかに示されるヌクレオチド配列を包含する。

36

【００７０】

本発明はさらに、配列番号３～５９のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードするいずれかの核酸配列の変異形および断片を企図する。ポリヌクレオチドの「断片」は、ポリペプチドの生物学的活性部分をコードしてよいか、または本明細書の他所に記載する方法において用いるハイブリダイゼーションプローブまたはＰＣＲプライマーとして使用できる断片であってもよい。ポリヌクレオチドの断片であるポリヌクレオチドは、少なくとも約１５、２０、５０、７５、１００、２００、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０の連続するヌクレオチド、または意図された使用（例えば本明細書に記載するＨＰＰＤ核酸）に応じて、本明細書に開示する完全長ポリヌクレオチドに存在するヌクレオチドの数までを含む。「連続する」ヌクレオチドとは、互いが直接に隣接するヌクレオチド残基を意図する。

【００７１】

本発明のポリヌクレオチドの断片は、一般に、完全長ＨＰＰＤ阻害除草剤耐性タンパク質の生物活性、すなわち除草剤に対する耐性活性を保持するポリペプチド断片をコードし得る。「除草剤に対する耐性活性を保持する」は、該断片が、配列番号２として本明細書に開示される、完全長ＨＰＰＤ阻害除草剤耐性タンパク質の除草剤に対する耐性活性の少なくとも約３０％、少なくとも約５０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、１１０％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、少なくとも約３００％、またはそれを超える耐性活性を有することを意図する。除草剤に対する耐性活性を測定するための方法は、当該技術分野において公知であり、かつ代表的な方法は本明細書に記載される。限定されない例によれば、本発明の断片は、ＨＰＰＤ阻害除草剤の同用量に対して耐性であるか、またはＨＰＰＤ阻害除草剤の２×、３×、４×、またはそれよりも多い用量に対して耐性であり、または該断片は、該断片と配列番号２との間のｐＩ５０またはK_iに基づいて、またはそれよりもさらに耐性である。

【００７２】

本発明のポリペプチドの生物学的活性部分をコードするポリヌクレオチドの断片は、少なくとも約１５０、１７５、２００、２５０、３００、３５０の連続するアミノ酸、または本発明の完全長ポリペプチドに存在するアミノ酸の総数までをコードする。限定されない例によれば、本発明のポリペプチドの生物学的活性部分をコードす

るポリヌクレオチドの断片は、配列番号２のアミノ酸の位置１８８、１８９、２１５、３３５、３３６、３３９、および３４０の１以上を含む。

【００７３】

本発明はまた、上記の変異ポリヌクレオチドも包含する。ポリヌクレオチドの「変異体」は、本発明のＨＰＰＤをコードするが遺伝コードの縮重のため保存的に異なる配列、および十分に同一である配列もまた包含する。本発明の変異体は、ＨＰＰＤ酵素活性およびＨＰＰＤ除草剤阻害剤に対する耐性を保持し得る。用語「十分に同一」は、標準的なパラメータを用いたアラインメントプログラムによって参照配列と比較した際、少なくとも約６０％または６５％の配列同一性、約７０％または７５％の配列同一性、約８０％または８５％の配列同一性、約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を意図する。当業者はこれらの値が、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、読み枠の位置などを考慮した上で適切に調整され、２つのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの対応する同一性が決定されることを認識するであろう。

【００７４】

細菌遺伝子は、翻訳開始領域の近傍に、非常にしばしば複数のメチオニン開始コドンを有する。しばしばこれらの開始コドンの１以上における翻訳開始によって、機能的タンパク質が生成される。これらの開始コドンはＡＴＧコドンを含み得る。しかしながら、バチルス種のような細菌はコドンＧＴＧもまた開始コドンとして認識し、かつＧＴＧコドンにおいて翻訳が開始されるタンパク質は、最初のアミノ酸としてメチオニンを含む。さらに、細菌においてこれらのコドンのうちのどれが天然の状態で用いられるかについて演繹的に判定されることは少ない。このように、メチオニンコドンの代替コドンのうちの一つを用いることで、除草剤に対する耐性を付与する変異形が生成されるであろうことが理解される。これらの除草剤耐性タンパク質は本発明に包含され、本発明の方法において使用され得る。天然の対立遺伝子変異形は、以下に概説する周知の分子生物学技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）およびハイブリダイゼーション技術を用いて同定できる。変異ポリヌクレオチドには、例えば部位特異的またはその他の変異誘発法を用いて産生されたが、所望の生物活性を有するポリペプチドをなおコードする、合成由来のポリヌクレオチドもまた含まれる。

【００７５】

当業者は、本発明のポリヌクレオチドのさらなる変異によって変更が導入され、これによってポリペプチドの生物活性を変化させることなく、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列にさらなる変更が導入されることをさらに理解するであろう。このように、単離された変異ポリヌクレオチドは、対応する本発明のＨＰＰＤをコードするポリヌクレオチドに、１以上のさらなるヌクレオチドによる置換、付加、または欠失を導入すること、例えばコードされたポリペプチドに１～５、１～１０、もしくは１～１５アミノ酸の置換、付加、または欠失、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、もしくは１５アミノ酸の置換、付加、または欠失を導入することによって作製できる。標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発およびＰＣＲを介した変異誘発、または遺伝子シャッフリング技術によってさらなる変異が導入され得る。このような変異ポリヌクレオチドもまた本発明に包含される。

【００７６】

変異ポリヌクレオチドは、飽和変異誘発(saturation mutagenesis)または置換変異誘発(permutational mutagenesis)のような、コード配列の全部または一部に沿った無作為な変異の導入によって作製可能であり、かつ得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するため、除草剤に対する耐性活性を付与する能力についてスクリーニングすることができる。

【００７７】

変異形を産生するためのさらなる方法としては、本明細書に開示するタンパク質を発現する細胞（またはそのライブラリー）を、タンパク質の活性にストレスを与える特異的条件下に供することが挙げられる。特異的条件としては、温度変化、ｐＨの変化、および基質または阻害剤の濃度の変化が挙げられる（しかしこれらに限定されない）。タンパク質ライブラリーは、タンパク質発現（例えば大腸菌またはその他の宿主における）の間に、またはタンパク質抽出物の作製後もしくはタンパク質の精製後に、これらの条件下に供してよい。

【００７８】

ストレス条件に供されたタンパク質ライブラリーの機能的または酵素的活性は、次に参照タンパク質と比較することで、改善された特性を有するタンパク質を同定することができる。この活性比較は、成長スクリーニングの一部として、あるいはタンパク質の活性を定量する酵素アッセイの一部として行うことができる。改善されたものとして同定される特性としては、ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性、動態定数（K_m、K_i、V_{max}を含む）における変化、タンパク質の安定性、タンパク質の熱安定性、またはタンパク質温度の至適性が挙げられる。

【００７９】

Ｃ．単離されたタンパク質ならびにその変異体および断片

除草剤に耐性のポリペプチドもまた、本発明に包含される。除草剤に耐性のポリペプチドとしては、除草剤に耐性ではないポリペプチド（本明細書では、「混入タンパク質」とも称される）の約３０％、２０％、１０％、ま

たは５％よりも少ない重量の（乾燥重量による）ポリペプチドの調製が挙げられる。本発明における「除草剤耐性タンパク質」は、本明細書に開示されるＨＰＰＤポリペプチドを意図する。その断片、生物学的活性部分、および変異形もまた供給され、本発明の方法を実践するために用いられ得る。

【００８０】

「断片」または「生物学的活性部分」としては、除草剤に対する耐性活性を保持する、除草剤耐性タンパク質をコードするアミノ酸配列の一部を含むポリペプチド断片が挙げられる。除草剤耐性タンパク質の生物学的活性部分は、例えば、長さとして１０、２５、５０、１００またはそれを超えるアミノ酸を有するポリペプチドであってよい。このような生物学的活性部分は組換え技術によって調製され、除草剤に対する耐性活性について評価され得る。

【００８１】

「変異形」は、配列番号３～５９のいずれかに、少なくとも約６０％、６５％、約７０％、７５％、約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドを意図し、ここで前記変異形はＨＰＰＤ酵素活性およびＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を有する。当業者はこれらの値が、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、読み枠の位置などを考慮した上で適切に調整され、２つのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの対応する同一性が決定されることを認識するであろう。

【００８２】

例えば「保存的なアミノ酸置換」は、１以上の非必須アミノ酸残基に対して行われてよい。「非必須」アミノ酸残基は、生物活性を変化させることなく、ポリペプチドの参照配列から変更可能な残基であるが、「必須」アミノ酸残基は生物活性に必要である。「保存的なアミノ酸置換」では、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基によって置換される、同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。アミノ酸置換は、機能が保持されている、保存されていない領域において行われてもよい。一般にこのような置換は、保存されたアミノ酸

残基に対して、または保存されたモチーフ内に存在するアミノ酸残基に対して、これらの残基がポリペプチド活性に必須である場合には行わない。しかしながら当業者は、機能的な変異形が、保存された残基において、保存されたかまたは保存されていない少数の変更を有し得ることを理解するであろう。

【００８３】

本発明のＨＰＰＤに対する、またはその変異形もしくは断片に対する抗体もまた包含される。抗体を産生するための方法は当該技術分野において公知である（例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙＭａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ、米国特許第４，１９６，２６５号を参照されたい）。

【００８４】

このように本発明の一態様は、本発明のタンパク質もしくはペプチド分子の１以上に特異的に結合する抗体、単鎖抗原結合分子、またはその他のタンパク質、およびそれらのホモログ、融合体、または断片に関する。特に好ましい実施形態によれば、抗体は、配列番号３～５９に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に特異的に結合する。別の実施形態によれば、抗体は、配列番号３～５９に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質またはその断片に特異的に結合する。

【００８５】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質もしくはペプチド分子を定量的または定性的に検出するため、またはタンパク質の翻訳後修飾を検出するために用いられてよい。本明細書で用いられる抗体またはペプチドは、これらの本発明のタンパク質またはペプチド分子への結合が関連しない分子の存在によって競合的に阻害されない場合、「特異的に結合」すると考えられる。

【００８６】

Ｄ．遺伝子スタッキング

農作物の商業的産生においては、信頼のおける駆除剤による管理の下で、農業植物の耕作地から不要な植物（すなわち「雑草」）を除去することが望ましい。理想的な処理は、耕作地全体に適用可能であるが、不要な植物のみが除去されて、農業植物は影響されない。このような処理システムの一つは、除草剤に対して耐性である農業植物の耕作地に除草剤をスプレーした際、農業植物は成長し続けるが、除草剤に対する耐性をもたない雑草は死滅するかまたはひどく損傷されるように、除草剤に対して耐性である農業植物を使用することに関連し得る。理想的には、このような処理システムは、雑草の防除によって柔軟性と経済性との可能な最良の組み合わせが提供され得るように、除草剤の特性を変化させることの利点

41

を享受し得る。例えば、耕作地において個別の除草剤の持続性は様々であり、幾つかの除草剤は耕作地に散布された後、比較的長期間有効であるが、その他の除草剤は、他の化合物および／または無効な化合物へと迅速に分解される。理想的な処理システムにおいては、栽培者が特定の状況に応じて除草剤を選択できるように、異なる除草剤の使用が許容され得る。

【００８７】

多数の、除草剤に対して耐性である農業植物が現在市販されているが、市販の除草剤および除草剤／農作物の組み合わせの多くに発生する問題は、一般的な雑草種に対する個々の除草剤の活性スペクトルが、典型的には不完全なことである。これまで使用されてきた個々の除草剤の多くに対して、除草剤に抵抗性である雑草の種および生物型がさらに蔓延している（例えばＴｒａｎｅｌ ａｎｄ Ｗｒｉｇｈｔ（２００２）Ｗｅｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ ５０：７００－７１２；Ｏｗｅｎ ａｎｄ Ｚｅｌａｙａ（２００５）ＰｅｓｔＭａｎａｇ．Ｓｃｉ．６１：３０１－３１１を参照されたい）。１を超える除草剤に耐性のトランスジェニック植物について記載されているが（例えば国際公開第２００５／０１２５１５号を参照されたい）、農作物の産生、雑草防除の選択、残った雑草に対する防除の延長、および農作物収穫の改善についてのすべての態様の改善が必要とされ続けている。

【００８８】

本発明のＨＰＰＤタンパク質またはヌクレオチド配列は、これらの植物に有用な農学的特性を付与するタンパク質またはＲＮＡをコードするその他の遺伝子と有利に組み合わされる。形質転換された植物に有用な農学的特性を付与するタンパク質またはＲＮＡをコードする遺伝子のうち、化学構造がＨＰＰＤ阻害除草剤とは異なる、１以上の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質、特定の昆虫に対する耐性を付与するその他のタンパク質、および特定の疾病に対する耐性を付与するタンパク質をコードするＤＮＡ配列、線虫または昆虫防除に役立つＲＮＡをコードするＤＮＡなどについて言及することができる。

【００８９】

このような遺伝子については特に、それぞれにその全体が参照により本明細書に取り込まれる、ＰＣＴ特許出願の国際公開第９１／０２０７１号および国際公開第９５／０６１２８号、ならびに米国特許第７，９２３，６０２号および米国特許出願公開第２０１００１６６７２３号に記載されている。

【００９０】

形質転換された植物細胞および植物に、特定の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質をコードするＤＮＡ配列のうち、国際公開第２００９／１５２３５９号に記載される、グルホシネート除草剤に対する耐性を付与するｂａｒもしくはＰＡＴ遺伝子またはストレプトマイセス

42

・セリカラー遺伝子、例えばグリホサートおよびその塩のようなＥＰＳＰＳが標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なＥＰＳＰＳをコードする遺伝子（米国特許第４，５３５，０６０号、米国特許第４，７６９，０６１号、米国特許第５，０９４，９４５号、米国特許第４，９４０，８３５号、米国特許第５．１８８．６４２号、米国特許第４，９７１，９０８号、米国特許第５，１４５，７８３号、米国特許第５，３１０，６６７号、米国特許第５，３１２，９１０号、米国特許第５，６２７，０６１号、米国特許第５，６３３，４３５号）、グリホサート－ｎ－アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子（例えば、米国特許第８，２２２，４８９号、米国特許第８，０８８，９７２号、米国特許第８，０４４，２６１号、米国特許第８，０２１，８５７号、米国特許第８，００８，５４７号、米国特許第７，９９９，１５２号、米国特許第７，９９８，７０３号、米国特許第７，８６３，５０３号、米国特許第７，７１４，１８８号、米国特許第７，７０９，７０２号、米国特許第７，６６６，６４４号、米国特許第７．６６６．６４３号、米国特許第７，５３１，３３９号、米国特許第７，５２７，９５５号、および米国特許第７，４０５，０７４号）、またはグリホサート酸化還元酵素をコードする遺伝子（例えば、米国特許第５，４６３，１７５号）について言及することができる。

【００９１】

ＥＰＳＰＳが標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なＥＰＳＰＳをコードするＤＮＡ配列のうち、さらに、植物ＥＰＳＰＳ、特にトウモロコシＥＰＳＰＳ、特に二つの変異を有するトウモロコシＥＰＳＰＳ、特にアミノ酸の位置１０２における変異およびアミノ酸の位置１０６における変異（国際公開第２００４／０７４４４３号）、および以下二重変異トウモロコシＥＰＳＰＳまたは２ｍＥＰＳＰＳと称される、米国特許第６５６６５８７号に記載されるＥＰＳＰＳをコードする遺伝子、またはアグロバクテリウムから分離したＥＰＳＰＳをコードする遺伝子、および米国特許第５，６３３，４３５号の配列番号２および配列番号３に記載され、ＣＰ４とも称されるＥＰＳＰＳをコードする遺伝子について特に言及され得る。

【００９２】

ＥＰＳＰＳが標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なＥＰＳＰＳをコードするＤＮＡ配列のうち、さらに、アルスロバクター・グロビフォルミス(Arthrobacter globiformis)由来のＥＰＳＰＳ　ＧＲＧ２３をコードする遺伝子、また国際公開第２００８／１００３５３号に記載される変異体ＧＲＧ２３　ＡＣＥ１、ＧＲＧ２３　ＡＣＥ２、またはＧＲＧ２３　ＡＣＥ３、特に国際公開第２００８／１００３５３号の配列番号２９であるＧＲＧ２３（ａｃｅ３）Ｒ１７３Ｋのような変異体または変異形ＧＲＧ２３についても特に言及され得る。

43

【００９３】
ＥＰＳＰＳをコードする、さらに詳細には上記の遺伝子をコードするＤＮＡ配列の場合に、これらの酵素をコードする配列は、輸送ペプチド、特に米国特許第５，５１０，４７１号または第５，６３３，４４８号に記載される「最適化された輸送ペプチド」をコードする配列の後に、有利に配置される。
【００９４】
本発明の核酸配列と組み合わせてよい代表的な除草剤耐性形質としてはさらに、少なくとも１のＡＬＳ（アセト乳酸合成酵素）阻害剤（国際公開第２００７／０２４７８２号）、変異シロイヌナズナ属ＡＬＳ／ＡＨＡＳ遺伝子（米国特許第６，８５５，５３３号）、代謝によって２，４－Ｄ（２，４－ジクロロフェノキシ酢酸）に対する耐性を付与する２，４－Ｄ－モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子（米国特許第６，１５３，４０１号）、および代謝によってジカンバ（３，６－ジクロロ－２－メトキシ安息香酸）に対する耐性を付与するジカンバモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子（米国特許第２００８／０１１９３６１号および米国特許第２００８／０１２０７３９号）が挙げられる。
【００９５】
様々な実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤには１以上のさらなるＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性の遺伝子を含む１以上の除草剤に耐性の遺伝子、および／または１以上のグリホサートおよび／またはグルホシネートに耐性の遺伝子がスタックされる。一実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤは、２ｍＥＰＳＰＳおよびｂａｒと組み合わされる。
【００９６】
昆虫に対する耐性の特性に関わるタンパク質をコードするＤＮＡ配列のうち、文献に広く記載され、かつ当業者に周知のＢｔタンパク質について特に言及され得る。フォトラブダス属のような細菌から抽出したタンパク質についても言及され得る（国際公開第９７／１７４３２号および国際公開第９８／０８９３２号）。
【００９７】
昆虫に対する耐性の新規な特性を付与する、関心のあるタンパク質をコードするＤＮＡ配列のうち、さらに、文献に広く記載され、かつ当業者に周知のＢｔ　ＣｒｙまたはＶＩＰタンパク質について特に言及され得る。これらとしては、Ｃｒｙ１Ｆタンパク質またはハイブリッド由来のＣｒｙ１Ｆタンパク質（例えば米国特許第６，３２６，１６９号、米国特許第６，２８１，０１６号、米国特許第６，２１８，１８８号に記載されるハイブリッドＣｒｙ１Ａ－Ｃｒｙ１Ｆタンパク質またはその毒性断片）、Ｃｒｙ１Ａ型タンパク質またはその毒性断片、好ましくはＣｒｙ１Ａｃタンパク質またはＣｒｙ１Ａｃタンパク質由来のハイブリッド（例えば米国特許第５，８８０，２７５号に記載のハイブリッドＣｒｙ１Ａｂ－Ｃ

44

ｒｙ１Ａｃタンパク質）または欧州特許第４５１８７８号に記載されるＣｒｙ１ＡｂもしくはＢｔ２タンパク質またはそれらの殺虫性断片、国際公開第０２／０５７６６号に記載されるＣｒｙ２Ａｅ、Ｃｒｙ２Ａｆ、もしくはＣｒｙ２Ａｇタンパク質またはその毒性断片、国際公開第２００７／１４０２５６号（配列番号７）に記載されるＣｒｙ１Ａ．１０５タンパク質またはその毒性断片、ＮＣＢＩ受託番ＡＢＧ２０４２８のＶＩＰ３Ａａ１９タンパク質、ＮＣＢＩ受託番号ＡＢＧ２０４２９（国際公開第２００７／１４２８４０号の配列番号２）のＶＩＰ３Ａａ２０タンパク質、ＣＯＴ２０２またはＣＯＴ２０３綿（それぞれ国際公開第２００５／０５４４７９号および国際公開第２００５／０５４４８０号）において産生されるＶＩＰ３Ａタンパク質、国際公開第０１／４７９５２号に記載されるＣｒｙタンパク質、Ｅｓｔｒｕｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２８；９３（１１）：５３８９－９４および米国特許第６，２９１，１５６号に記載されるＶＩＰ３Ａａタンパク質またはその毒性断片、ゼノラブダス属（国際公開第号９８／５０４２７号に記載される）、セラチア属（Ｓ．エントモフィラ由来の）またはフォトラブダス属の株に由来する殺虫性タンパク質、例えば国際公開第９８／０８９３２号に記載されるフォトラブダス属由来のＴｃタンパク質（例えばＷａｔｅｒｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ａｐｐｌ Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６７（１１）：５０１７－２４；Ｆｆｒｅｎｃｈ－Ｃｏｎｓｔａｎｔ ａｎｄ Ｂｏｗｅｎ，２０００，Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．；５７（５）：８２８－３３）が挙げられる。これらのタンパク質のいずれかにおいて、上記配列のいずれかに由来する幾つかの（１～１０、好ましくは１～５）アミノ酸が異なる、いずれかの変異形または変異体、特にそれらの毒性断片の、または色素体輸送ペプチドのような輸送ペプチドの、またはその他のタンパク質もしくはペプチドとの融合物の配列もまた、本明細書に包含される。
【００９８】
様々な実施形態によれば、植物において本発明のＨＰＰＤ配列は、除草剤耐性、昆虫耐性、乾燥耐性、線虫防除された、効率良い水使用、効率良い窒素使用、改善された栄養値、疾病抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された再生などのような望ましい形質を付与する１以上の遺伝子と組み合わせることができる。
【００９９】
同種の植物において本発明の遺伝子と組み合わせてもよい（例えば交雑によって、または本発明のキメラ遺伝子による別のトランスジェニック体(transgenic event)を含む植物を再形質転換することによって）、特に有用なトランスジェニック体としては、トランスジェニック体

45

(Event)５３１／ＰＶ－ＧＨＢＫ０４（綿、昆虫防除、国際公開第２００２／０４０６７７号に記載される）、トランスジェニック体１１４３－１４Ａ（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０６／１２８５６９号に記載される）、トランスジェニック体１１４３－５１Ｂ（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０６／１２８５７０号に記載される）、トランスジェニック体１４４５（綿、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００２－１２０９６４号または国際公開第０２／０３４９４６号に記載される、トランスジェニック体１７０５３（米、除草剤耐性、ＰＴＡ－９８４３として寄託される、国際公開第１０／１１７７３７号に記載される）、トランスジェニック体１７３１４（米、除草剤耐性、ＰＴＡ－９８４４として寄託される、国際公開第１０／１１７７３５号に記載される）、トランスジェニック体２８１－２４－２３６（綿、昆虫防除－除草剤耐性、ＰＴＡ－６２３３として寄託される、国際公開第０５／１０３２６６号または米国特許出願公開Ａ２００５－２１６９６９号に記載される）、トランスジェニック体３００６－２１０－２３（綿、昆虫防除－除草剤耐性、ＰＴＡ－６２３３として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００７－１４３８７６号または国際公開第０５／１０３２６６号に記載される）、トランスジェニック体３２７２（トウモロコシ、品質形質、ＰＴＡ－９９７２として寄託される、国際公開第０６／０９８９５２号または米国特許出願公開Ａ２００６－２３０４７３号に記載される）、トランスジェニック体３３３９１（コムギ、除草剤耐性、ＰＴＡ－２３４７として寄託される、国際公開第号２００２／０２７００４号に記載される）、トランスジェニック体４０４１６（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－１１５０８として寄託される、国際公開第１１／０７５５９３号に記載される）、トランスジェニック体４３Ａ４７（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－１１５０９として寄託される、国際公開第１１／０７５５９５号に記載される）、トランスジェニック体５３０７（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－９５６１として寄託される、国際公開第１０／０７７８１６号に記載される）、トランスジェニック体ＡＳＲ－３６８（ベントグラス、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－４８１６として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００６－１６２００７号または国際公開第０４／０５３０６２号に記載される）、トランスジェニック体Ｂ１６（トウモロコシ、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００３－１２６６３４号に記載される）、トランスジェニック体ＢＰＳ－ＣＶ１２７－９（大豆、除草剤耐性、ＮＣＩＭＢ　Ｎｏ．４１６０３として寄託される、国際公開第１０／０８０８２９号に記載される）、トランスジェニック体ＢＬＲ１（アブラナ、雄性不稔の回復、ＮＣＩＭＢ　４１１９３として寄託される

46

、国際公開第号２００５／０７４６７１号に記載される）、トランスジェニック体ＣＥ４３－６７Ｂ（綿、昆虫防除、ＤＳＭ　ＡＣＣ２７２４として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００９－２１７４２３または国際公開第０６／１２８５７３号に記載される）、トランスジェニック体ＣＥ４４－６９Ｄ（綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２０１０－００２４０７７号に記載される）、トランスジェニック体ＣＥ４４－６９Ｄ（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０６／１２８５７１号に記載される）、トランスジェニック体ＣＥ４６－０２Ａ（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０６／１２８５７２号に記載される）、トランスジェニック体ＣＯＴ１０２（綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００６－１３０１７５号または国際公開第０４／０３９９８６号に記載される）、トランスジェニック体ＣＯＴ２０２（綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００７－０６７８６８号または国際公開第０５／０５４４７９号に記載される）、トランスジェニック体ＣＯＴ２０３（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０５／０５４４８０号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ２１６０６－３／１６０６（大豆、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１０２８として寄託される、国際公開第２０１２／０３３７９４号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ４０２７８（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－　１０２４４として寄託される、国際公開第１１／０２２４６９号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ－４４４０６－６／ｐＤＡＢ８２６４．４４．０６．１（大豆、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１３３６として寄託される、国際公開第２０１２／０７５４２６号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ－１４５３６－７／ｐＤＡＢ８２９１．４５．３６．２（大豆、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１３３５として寄託される、国際公開第２０１２／０７５４２９号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ－５９１２２－７（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　１１３８４として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００６－０７０１３９号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ－５９１３２（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第０９／１００１８８号に記載される）、トランスジェニック体ＤＡＳ６８４１６（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－１０４４２として寄託される、国際公開第１１／０６６３８４号または国際公開第１１／０６６３６０号に記載される）、トランスジェニック体ＤＰ－０９８１４０－６（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８２９６として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００９－１３７３９５号または国際公開第０８／１１２０１９号に記載される）、トランスジェニック体ＤＰ－３０５４２３－１（大豆、品質形質、寄託されていな

47

い、米国特許出願公開Ａ２００８－３１２０８２号または国際公開第０８／０５４７４７号に記載される）、トランスジェニック体ＤＰ－３２１３８－１（トウモロコシ、ハイブリダイゼーション系、ＡＴＣＣＰＴＡ－９１５８として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００９－０２１０９７０号または国際公開第０９／１０３０４９号に記載される）、トランスジェニック体ＤＰ－３５６０４３－５（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８２８７として寄託される、米国特許出願公開Ａ２０１０－０１８４０７９号または国際公開第０８／００２８７２号に記載される）、トランスジェニック体ＥＥ－１（ナス、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０７／０９１２７７号に記載される）、トランスジェニック体ＦＩ１１７（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０９０３１として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００６－０５９５８１号または国際公開第９８／０４４１４０号に記載される）、トランスジェニック体ＦＧ７２（大豆、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１０４１として寄託される、国際公開第２０１１／０６３４１３号に記載される）、トランスジェニック体ＧＡ２１（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０９０３３として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００５－０８６７１９号または国際公開第９８／０４４１４０号に記載される）、トランスジェニック体ＧＧ２５（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０９０３２として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００５－１８８４３４号または国際公開第９８／０４４１４０号に記載される）、トランスジェニック体ＧＨＢ１１９（綿、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８３９８として寄託される、国際公開第０８／１５１７８０号に記載される）、トランスジェニック体ＧＨＢ６１４（綿、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－６８７８として寄託される、米国特許出願公開Ａ２０１０－０５０２８２号または国際公開第０７／０１７１８６号に記載される）、トランスジェニック体ＧＪ１１（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０９０３０として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００５－１８８４３４号または国際公開第９８／０４４１４０号に記載される）、トランスジェニック体ＧＭ　ＲＺ１３（サトウダイコン、ウイルス抵抗性、ＮＣＩＭＢ－４１６０１として寄託される、国際公開第１０／０７６２１２号に記載される）、トランスジェニック体Ｈ７－１（サトウダイコン、除草剤耐性、ＮＣＩＭＢ　４１１５８またはＮＣＩＭＢ　４１１５９として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００４－１７２６６９号または国際公開第０４／０７４４９２号に記載される）、トランスジェニック体ＪＯＰＬＩＮ１（コムギ、疾病耐性、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００８－０６４０３２号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬ２７（大豆、除草剤耐性、ＮＣＩＭＢ４１６５８として寄託される、国際公開第０６／１０８６７４号または米国特許出

48

願公開Ａ２００８－３２０６１６号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬ５５（大豆、除草剤耐性、ＮＣＩＭＢ　４１６６０として寄託される、国際公開第０６／１０８６７５号または米国特許出願公開Ａ２００８－１９６１２７号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬｃｏｔｔｏｎ２５（綿、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－３３４３として寄託される、国際公開第０３／０１３２２４号または米国特許出願公開Ａ２００３－　０９７６８７号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬＲＩＣＥ０６（米、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０３３５３として寄託される、米国特許第６，４６８，７４７号または国際公開第００／０２６３４５号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬＲｉｃｅ６２（米、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　２０３３５２として寄託される、国際公開第２０００／０２６３４５号に記載される）、トランスジェニック体ＬＬＲＩＣＥ６０１（米、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－２６００として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００８－２２８９０６０号または国際公開第００／０２６３５６号に記載される）、トランスジェニック体ＬＹ０３８（トウモロコシ、品質形質、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－５６２３として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００７－０２８３２２号または国際公開第０５／０６１７２０号に記載される）、トランスジェニック体ＭＩＲ１６２（トウモロコシ、昆虫防除、ＰＴＡ－８１６６として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００９－３００７８４号または国際公開第０７／１４２８４０号に記載される）、トランスジェニック体ＭＩＲ６０４（トウモロコシ、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００８－１６７４５６号または国際公開第０５／１０３３０１号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ１５９８５（綿、昆虫防除、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－２５１６として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００４－２５０３１７号または国際公開第０２／１００１６３号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ８１０（トウモロコシ、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００２－１０２５８２号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ８６３（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－２６０５として寄託される、国際公開第０４／０１１６０１号または米国特許出願公開Ａ２００６－０９５９８６号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ８７４２７（トウモロコシ、受粉コントロール、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７８９９として寄託される、国際公開第１１／０６２９０４号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ８７４６０（トウモロコシ、ストレス耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８９１０として寄託される、国際公開第０９／１１１２６３号または米国特許出願公開Ａ２０１１－０１３８５０４号に記載される）、トランスジェニック体ＭＯＮ８７７０１（大豆、昆虫防除、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８１９４として寄託される、米国特許出

49

願公開Ａ２００９－１３００７１号または国際公開第０９／０６４６５２号に記載される）、トランスジェニック体MON８７７０５（大豆、品質形質－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－９２４１として寄託される、米国特許出願公開Ａ２０１０－００８０８８７号または国際公開第１０／０３７０１６号に記載される）、トランスジェニック体MON８７７０８（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－９６７０として寄託される、国際公開第１１／０３４７０４号に記載される）、トランスジェニック体MON８７７１２（大豆、収穫高、ＰＴＡ－１０２９６として寄託される、国際公開第２０１２／０５１１９９号に記載される）、トランスジェニック体MON８７７５４（大豆、品質形質、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－９３８５として寄託される、国際公開第１０／０２４９７６号に記載される）、トランスジェニック体MON８７７６９（大豆、品質形質、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８９１１として寄託される、米国特許出願公開Ａ２０１１－００６７１４１号または国際公開第０９／１０２８７３号に記載される）、トランスジェニック体MON８８０１７（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－５５８２として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００８－０２８４８２号または国際公開第０５／０５９１０３号に記載される）、トランスジェニック体MON８８９１３（綿、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－４８５４として寄託される、国際公開第０４／０７２２３５号または米国特許出願公開Ａ２００６－０５９５９０号に記載される）、トランスジェニック体MON８８３０２（アブラナ、除草剤耐性、ＰＴＡ－１０９５５として寄託される、国際公開第２０１１／１５３１８６号に記載される）、トランスジェニック体MON８８７０１（綿、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１７５４として寄託される、国際公開第２０１２／１３４８０８号に記載される）、トランスジェニック体MON８９０３４（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７４５５として寄託される、国際公開第０７／１４０２５６号または米国特許出願公開Ａ２００８－２６０９３２号に記載される）、トランスジェニック体MON８９７８８（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－６７０８として寄託される、米国特許出願公開Ａ２００６－２８２９１５号または国際公開第０６／１３０４３６号に記載される）、トランスジェニック体ＭＳＩ　１（アブラナ、受粉コントロール－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８５０またはＰＴＡ－２４８５として寄託される、国際公開第０１／０３１０４２号に記載される）、トランスジェニック体ＭＳ８（アブラナ、受粉コントロール－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７３０として寄託される、国際公開第０１／０４１５５８号または米国特許出願公開Ａ２００３－１８８３４７号に記載される）、トランスジェニック体ＮＫ６０３（トウモロコシ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－２４７８として寄託される、米国特許出願公開

50

Ａ２００７－２９２８５４号に記載される）、トランスジェニック体ＰＥ－７（米、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０８／１１４２８２号に記載される）、トランスジェニック体ＲＦ３（アブラナ、受粉コントロール－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７３０として寄託される、国際公開第０１／０４１５５８号または米国特許出願公開Ａ２００３－１８８３４７号に記載される）、トランスジェニック体ＲＴ７３（アブラナ、除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第０２／０３６８３１号または米国特許出願公開Ａ２００８－０７０２６０号に記載される）、トランスジェニック体ＳＹＨＴ０Ｈ２／ＳＹＮ－０００Ｈ２－５（大豆、除草剤耐性、ＰＴＡ－１１２２６として寄託される、国際公開第２０１２／０８２５４８号に記載される）、トランスジェニック体Ｔ２２７－１（サトウダイコン、除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第０２／４４４０７号または米国特許出願公開Ａ２００９－２６５８１７号に記載される）、トランスジェニック体Ｔ２５（トウモロコシ、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００１－０２９０１４号または国際公開第０１／０５１６５４号に記載される）、トランスジェニック体Ｔ３０４－４０（綿、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－８１７１として寄託される、米国特許出願公開Ａ２０１０－０７７５０１号または国際公開第０８／１２２４０６号に記載される）、トランスジェニック体Ｔ３４２－１４２（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第０６／１２８５６８号に記載される）、トランスジェニック体ＴＣ１５０７（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開Ａ２００５－０３９２２６号または国際公開第０４／０９９４４７号に記載される）、トランスジェニック体ＶＩＰ１０３４（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－３９２５として寄託される、国際公開第０３／０５２０７３号に記載される）、トランスジェニック体３２３１６（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＰＴＡ－１１５０７として寄託される、国際公開第１１／０８４６３２号に記載される）、トランスジェニック体４１１４（トウモロコシ、昆虫防除－除草剤耐性、ＰＴＡ－１１５０６として寄託される、国際公開第１１／０８４６２１号に記載される）、トランスジェニック体ＥＥ－ＧＭ３／ＦＧ７２（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１０４１、国際公開第２０１１／０６３４１３Ａ２号）、トランスジェニック体ＤＡＳ－６８４１６－４（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４４２、国際公開第２０１１／０６６３６０Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＡＳ－６８４１６－４（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４４２、国際公開第２０１１／０６６３８４Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＰ－０４０４１６－８（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１５０８

51

、国際公開第２０１１／０７５５９３Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＰ－０４３Ａ４７－３（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１５０９、国際公開第２０１１／０７５５９５Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＰ－００４１１４－３（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１５０６、国際公開第２０１１／０８４６２１Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＰ－０３２３１６－８（トウモロコシ、昆虫防除、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１５０７、国際公開第２０１１／０８４６３２Ａ１号）、トランスジェニック体ＭＯＮ－８８３０２－９（アブラナ、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０９５５、国際公開第２０１１／１５３１８６Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＡＳ－２１６０６－３（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１０２８、国際公開第２０１２／０３３７９４Ａ２号）、トランスジェニック体ＭＯＮ－８７７１２－４（大豆、品質形質、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０２９６、国際公開第２０１２／０５１１９９Ａ２号）、トランスジェニック体ＤＡＳ－４４４０６－６（大豆、スタックされた除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１３３６、国際公開第２０１２／０７５４２６Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＡＳ－１４５３６－７（大豆、スタックされた除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１３３５、国際公開第２０１２／０７５４２９Ａ１号）、トランスジェニック体ＳＹＮ－０００Ｈ２－５（大豆、除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１２２６、国際公開第２０１２／０８２５４８Ａ２号）、トランスジェニック体ＤＰ－０６１０６１－７（アブラナ、除草剤耐性、受託番号該当なし、国際公開第２０１２０７１０３９Ａ１号）、トランスジェニック体ＤＰ－０７３４９６－４（アブラナ、除草剤耐性、受託番号該当なし、米国特許第２０１２１３１６９２号）、トランスジェニック体８２６４．４４．０６．１（大豆、スタックされた除草剤耐性、受託番号ＰＴＡ－１１３３６、国際公開第２０１２０７５４２６Ａ２号）、トランスジェニック体８２９１．４５．３６．２（大豆、スタックされた除草剤耐性、受託番号ＰＴＡ－１１３３５、国際公開第２０１２０７５４２９Ａ２号）、トランスジェニック体ＳＹＨＴ０Ｈ２（大豆、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１２２６、国際公開第２０１２／０８２５４８Ａ２号）、トランスジェニック体ＭＯＮ８８７０１（綿、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１７５４、国際公開第２０１２／１３４８０８Ａ１号）、トランスジェニック体ＫＫ１７９－２（アルファルファ、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１８３３、国際公開第２０１３００３５５８Ａ１号）、トランスジェニック体ｐＤＡＢ８２６４．４２．３２．１（大豆、スタックされた除草剤耐性、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１１９９３、国際公開第２０１３０１００９４Ａ１号）、トランスジェニック体ＭＺＤＴ０９Ｙ（トウモロコシ、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１３０２

52

５、国際公開第２０１３０１２７７５Ａ１号）が挙げられる。

【０１００】

Ｅ．ポリヌクレオチドコンストラクト

本発明のＨＰＰＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、植物細胞に発現させるか、または発現を増大させるために改変されてよい。本明細書で同定するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、関心のある植物に発現させるための発現カセット内に供給される。「植物発現カセット」には、組換えＤＮＡコンストラクトを包含する、植物細胞内にポリヌクレオチドを発現させることができるＤＮＡコンストラクトが含まれる。カセットには、５’－３’の転写方向へ、関心のある１以上のポリヌクレオチドへ操作可能に連結する(operably-linked)転写開始領域（すなわちプロモーター、特に異種性プロモーター）および／または植物内で機能する翻訳および転写終止領域（すなわち終止領域）が含まれてよい。カセットには、生物に導入される少なくとも１のさらなるポリヌクレオチド、例えば選択性マーカー遺伝子がさらに含まれてもよい。あるいは複数の発現カセット内に、単数または複数のさらなるポリヌクレオチドが供給されてもよい。このような発現カセットには、単数または複数のポリヌクレオチドを、これらが調節性領域によって転写調節されるように挿入するための複数の制限酵素部位が設けられる。

【０１０１】

さらなる実施形態によれば、本発明は、植物に発現可能なプロモーターに操作可能に連結する異種性の本発明の核酸ならびに任意に転写終止およびポリアデニル化領域を含む配列をコードするキメラ遺伝子に関する。「異種性の」は一般に、細胞に内在しないかまたはそれが存在する天然のゲノムの位置に内在せず、かつ感染、トランスフェクション、微量注入法、エレクトロポレーション、顕微鏡投影法などによって細胞に加えられたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。「操作可能に連結する」は、二つのポリヌクレオチドの間の操作可能な結合を意図する。例えばプロモーターがＤＮＡ配列へ操作可能に連結すると、プロモーター配列はＤＮＡ配列の転写を開始および仲介する。操作可能連結するポリヌクレオチドは、連続してよいか、または連続していなくてもよく、かつこの語が二つのポリペプチドのコード領域の連結を指すために用いられる場合には、該ポリペプチドは同じ読み枠において発現することが認識される。

【０１０２】

プロモーターは、選択された植物細胞、植物の部分、または植物において転写活性を示すいずれかのポリヌクレオチド配列であってよい。プロモーターは、植物宿主に対して、かつ／または本発明のＤＮＡ配列に対して、天然もしくは類似、または外来性もしくは異種性であってよい。プロモーターが植物宿主に対して「天然」または

53

「類似」である場合、プロモーターを導入する天然植物内に該プロモーターが見出されることを意図する。プロモーターが本発明のＤＮＡ配列に対して「外来性」または「異種性」である場合、該プロモーターは、操作可能に連結された本発明のＤＮＡ配列のための自然に存在するかまたは天然のプロモーターではないことが意図される。プロモーターは誘導性または恒常性であってよい。プロモーターは自然に存在してよいか、自然に存在する様々なプロモーターの一部から構成されてよいか、または部分的もしくは完全に合成されてもよい。プロモーターの設計に対するガイダンスが、Ｈａｒｌｅｙ ａｎｄ Ｒｅｙｎｏｌｄｓ（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１５：２３４３－２３６１のようなプロモーター構造の研究によって提供されている．また、転写開始点に対するプロモーターの配置も最適化され得る。例えばＲｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７６：７６０－７６４を参照されたい。植物における使用に適した多くのプロモーターが当該技術分野において公知である。

【０１０３】

例えば植物における使用に適した恒常性プロモーターとしては、ピーナッツ退緑条斑カリモウイルス（ＰＣ１ＳＶ）プロモーターのような植物ウイルス由来のプロモーター（米国特許第５，８５０，０１９号）、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）由来の３５Ｓプロモーター（Ｏｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３：８１０－８１２）、クロレラウイルスメチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター（米国特許第５，５６３，３２８号）、およびゴマノハグサモザイクウイルス（ＦＭＶ）由来の完全長転写プロモーター（米国特許第５，３７８，６１９号）、米アクチン（ＭｃＥｌｒｏｙ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ２：１６３－１７１および米国特許第５，６４１，８７６号）、ユビキチン（Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１２：６１９－６３２およびＣｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８：６７５－６８９）、ｐＥＭＵ（Ｌａｓｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８１：５８１－５８８）、ＭＡＳ（Ｖｅｌｔｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：２７２３－２７３０、および米国特許第５，５１０，４７４号）、トウモロコシＨ３ヒストン（Ｌｅｐｅｔｉｔ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２３１：２７６－２８５およびＡｔａｎａｓｓｏｖａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｊ．２（３）：２９１－３００）、セイヨウアブラナＡＬＳ３（ＰＣＴ出願国際公開第９７／４１２２８号）、植物リブロース－ビスカルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（ＲｕＢｉｓＣＯ）小サブユニット遺伝子、サーコウイルス（オーストラリア特許第６８９３１１号）、またはキャッサバ葉脈モザイクウイルス（ＣｓＶＭＶ、米国特許第７，０５３，２０５号）のような遺伝子由来のプロモーター、および様々なアグロバクテリウム遺伝子のプロモーター（米国特許第４，７７１，００２号、第５，１０２，７９６号、第５，１８２，２００号、および第５，４２８，１４７号）が挙げられる。

54

【０１０４】

植物における使用に適した誘導性プロモーターとしては、銅に反応するＡＣＥ１系に由来するプロモーター（Ｍｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＰＮＡＳ ９０：４５６７－４５７１）、ベンゼンスルホンアミド除草剤の毒性緩和剤に反応するトウモロコシＩｎ２遺伝子のプロモーター（Ｈｅｒｓｈｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２２７：２２９－２３７およびＧａｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２４３：３２－３８）、およびＴｎ１０に由来するＴｅｔ抑制因子のプロモーター（Ｇａｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２２７：２２９－２３７）が挙げられる。植物において用いられる別の誘導性プロモーターは、植物が通常反応しない誘導薬剤に反応するものである。この型の代表的な誘導性プロモーターは、その転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンによって誘導される、ステロイドホルモン遺伝子由来の誘導性プロモーター（Ｓｃｈｅｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１０４２１）、またはエストラジオールにより活性化される、エストロゲン受容体に基づいた誘導性の植物発現系において用いるための、キメラ転写活性化因子であるＸＶＥの最近の応用である（Ｚｕｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｊ．，２４：２６５－２７３）。植物において用いられるその他の誘導性プロモーターは、その全体が参照によって本明細書に取り込まれる、欧州特許第３３２１０４号、ＰＣＴ国際公開第９３／２１３３４号、およびＰＣＴ国際公開第９７／０６２６９号に記載される。その他のプロモーターの一部から構成されるプロモーター、および部分的または完全な合成プロモーターもまた用いることができる。例えばこのようなプロモーターの植物における使用について記載される、Ｎｉ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｐｌａｎｔ Ｊ．７：６６１－６７６およびＰＣＴ国際公開第９５／１４０９８号を参照されたい。

【０１０５】

本発明の一実施形態によれば、植物の特定の領域または組織に特異的なプロモーター配列は、本発明のＨＰＰＤタンパク質を発現させるために用いることができ、このようなプロモーターとしては、種子特異的プロモーター（Ｄａｔｌａ， Ｒ． ｅｔ ａｌ．， １９９７，

55

Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｎｎ. Ｒｅｖ. ３, ２６９－２９６）、特にナピンプロモーター（欧州特許第２５５３７８Ａ１号）、ファゼオリンプロモーター、グルテニンプロモーター、ヘリアンシニン（ｈｅｌｉａｎｔｈｉｎｉｎ）プロモーター（国際公開第９２／１７５８０号）、アルブミンプロモーター（国際公開第９８／４５４６０号）、オレオシンプロモーター（国際公開第９８／４５４６１号）、ＳＡＴ１プロモーターまたはＳＡＴ３プロモーター（ＰＣＴ／米国特許出願公開第９８／０６９７８号）が挙げられる。

【０１０６】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（ＰＡＬ）、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素（HMG）、キチナーゼ、グルカナーゼ、プロテイナーゼ阻害剤（ＰＩ）、ＰＲ１ファミリー遺伝子、ノパリン合成酵素（ｎｏｓ）、およびｖｓｐＢプロモーター（米国特許第５６７０３４９号、表３）、HMG２プロモーター（米国特許第５６７０３４９号）、リンゴベータガラクトシダーゼ（ＡＢＧ１）プロモーター、およびリンゴアミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素（ＡＣＣ合成酵素）プロモーター（国際公開第９８／４５４４５号）から有利に選択される誘導性プロモーターもまた使用され得る。本発明のコンストラクトには複数のプロモーターが用いられてよく、これらを連続して用いてもよい。

【０１０７】

プロモーターは１以上のエンハンサーエレメントを含んでよく、またはこれを含むように改変されてもよい。幾つかの実施形態によれば、プロモーターは複数のエンハンサーエレメントを含んでよい。エンハンサーエレメントを含むプロモーターの転写レベルは、これを含まないプロモーターに比較して高い。植物における使用に適したエンハンサーエレメントとしては、ＰＣ１ＳＶエンハンサーエレメント（米国特許第５，８５０，０１９号）、ＣａＭＶ ３５Ｓエンハンサーエレメント（米国特許第５，１０６，７３９号および第５，１６４，３１６号）、およびFMVエンハンサーエレメント（Ｍａｉｔｉ ｅｔ ａｌ.（１９９７）Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ. ６：１４３－１５６）、国際公開第８７／０７６４４号に記載されるタバコモザイクウイルス（TMV）の翻訳活性化因子、またはＣａｒｒｉｎｇｔｏｎ ＆ Ｆｒｅｅｄ １９９０，Ｊ. Ｖｉｒｏｌ. ６４：１５９０－１５９７に記載されるタバコエッチウイルス（ＴＥＶ）の翻訳活性化因子、または、例えばトウモロコシのａｄｈ１イントロンまたは米アクチンのイントロン１のようなイントロンが挙げられる。ＰＣＴ国際公開第９６／２３８９８号、国際公開第２０１２／０２１７９４号、国際公開第２０１２／０２１７９７号、国際公開第２０１１／０８４３７０号、および国際公開第２０１１／０２８９１４号も参照されたい。

【０１０８】

56

このようなコンストラクトはしばしば５’および３’非翻訳領域を含み得る。このようなコンストラクトは、関心のあるペプチドの、葉緑体（またはその他の色素体）、小胞体、またはゴルジ装置のような特定の細胞内構造への、翻訳と同時の、または翻訳後の輸送を促進するか、または分泌を促進する、「シグナル配列」または「リーダー配列」を含んでよい。例えばコンストラクトは、ペプチドの小胞体への移行を促進するシグナルペプチドを含むように改変されてよい。「シグナル配列」は、翻訳と同時の、または翻訳後の、細胞膜を横断するペプチド輸送をもたらすことが知られているか、またはもたらすと考えられている配列を意図する。このことは真核生物において、典型的には、幾らかのグリコシル化がもたらされるゴルジ装置への分泌に関わる。「リーダー配列」は、翻訳時にペプチド鎖を細胞内の細胞小器官へ翻訳と同時に輸送開始するために十分なアミノ酸配列である、いずれかの配列を意図する。このように、この語には、小胞体の通過、液胞、葉緑体を含む色素体、ミトコンドリアなどの通過による輸送および／またはグリコシル化を標的とするリーダー配列が包含される。発現にはmRNAにおけるイントロンのプロセシングが必要であることから、植物発現カセットがイントロンを含むように操作することもまた好ましい。

【０１０９】

「３’非翻訳領域」は、コード配列の下流に位置するポリヌクレオチドを意図する。mRNA前駆体の３’末端へのポリアデニル酸の付加経路に影響し得るポリアデニル化シグナル配列およびその他の調節性シグナルをコードする配列は３’非翻訳領域である。「５’非翻訳領域」は、コード配列の上流に位置するポリヌクレオチドを意図する。

【０１１０】

その他の上流または下流の非翻訳エレメントにはエンハンサーが含まれる。エンハンサーはプロモーター領域の発現増大に作用するポリヌクレオチドである。エンハンサーは当該技術分野において公知であり、ＳＶ４０エンハンサー領域および３５Ｓエンハンサーエレメントが挙げられるがこれらに限定されない。

【０１１１】

終止領域は転写開始領域に従った天然のものであってよいか、本発明の配列に従った天然のものであってよいか、またはその他の源に由来してもよい。オクトピン合成酵素およびノパリン合成酵素終止領域のような便利な終止領域が、A. ツメファシエンス(A.tumefaciens)のＴｉ－プラスミドから利用可能である。Ｇｕｅｒｉｎｅａｕ ｅｔ ａｌ.（１９９１）Ｍｏｌ. Ｇｅｎ. Ｇｅｎｅｔ. ２６２：１４１－１４４；Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ（１９９１）Ｃｅｌｌ ６４：６７１－６７４；Ｓａｎｆａｃｏｎ ｅｔ ａｌ.（１９９１）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ. ５：１４１－１４９；Ｍｏｇｅｎ ｅｔ ａｌ.（

57

1990）Plant Cell 2：1261－1272；Munroe et al.（1990）Gene 91：151－158；Ballas et al.（1989）Nucleic Acids Res. 17：7891－7903；Joshi et al.（1987）Nucleic Acid Res. 15：9627－9639、および欧州特許第0633317A1号も参照されたい。

【0112】

本発明の一態様によれば、合成DNA配列は、本発明のポリペプチドのような所定のポリペプチドのために設計される。細胞内で合成DNA配列の翻訳領域が発現されると、本発明のポリペプチドが産生される。合成DNA配列は、単に必要のない制限エンドヌクレアーゼ部位を除去するため、DNAクローニングの方法を容易にするため、コドンバイアスの可能性があるいずれかの部位を変更または除去するため、GC含量を変更または改善するため、別の読み枠を除去または変更するため、および／または天然のDNA配列に存在し得るイントロン／エクソンスプライシング認識部位、ポリアデニル化部位、シャイン・ダルガノ配列、必要のないプロモーターエレメントなどを変更または除去するために有用であり得る。合成DNA配列はまた、DNA配列へのその他の改善の導入、例えばイントロン配列の導入、葉緑体輸送ペプチド、アポプラスト／液胞ターゲティングペプチド、または得られたペプチドを小胞体内に保持するペプチド配列のような細胞小器官へのターゲティング配列と融合したタンパク質として発現されるDNA配列の作製のために利用されてもよい。合成遺伝子はまた、発現を改善させるために宿主細胞に優先的なコドンを用いて合成されてよいか、または宿主に優先的なコドンの使用頻度にあるコドンを用いて合成されてもよい。例えば参照により本明細書に取り込まれる、Campbell andGowri（1990）Plant Physiol. 92：1－11、米国特許第6，320，100号、第6，075，185号、第5，380，831号、および第5，436，391号、米国特許出願公開第20040005600号および第20010003849号、ならびにMurray et al.（1989）Nucleic Acids Res. 17：477－498を参照されたい。

【0113】

一実施形態によれば、関心のあるポリヌクレオチドは、葉緑体への発現を標的としたものである。このように関心のあるポリヌクレオチドが葉緑体に直接挿入されない場合に、発現カセットは、該関心のあるヌクレオチドを葉緑体へ方向付けるため、輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み得る。このような輸送ペプチドは当該技術分野において公知である。例えば、Von Heijne et al.（1991）Plant Mol. Biol. Rep. 9：104－126；Clark et al.（1989）J. Biol. Chem. 264：17544－17550；Della－Cioppa et al.（1987）Plant Physiol. 84：965－968；Romer et al.（1993）Biochem. Biophys. Res. Commun. 196：1414－1421；およびShah et al.（1986）Science 233：478－481を参照されたい。

58

【0114】

葉緑体を標的とする関心のあるポリヌクレオチドは、植物の核と当該細胞小器官との間でのコドン使用の違いを考慮して、葉緑体における発現を最適化してよい。このように関心のあるポリヌクレオチドは、葉緑体に優先的なコドンを用いて合成され得る。例えば参照により本明細書に取り込まれる、米国特許第5，380，831号を参照されたい。

【0115】

この植物発現カセットは、植物形質転換ベクター内へ挿入することができる。「形質転換ベクター」は、細胞の形質転換を可能にするDNA分子を意図する。このような分子は1以上の発現カセットからなってよく、かつ1を超えるベクターDNA分子内へ構築されてよい。例えばバイナリーベクターは、植物細胞の形質転換に対して必要なすべてのシスおよびトランス作用機能をコードするため、二つの隣接しないDNAベクターを利用する植物形質転換ベクターである（Hellens and Mullineaux（2000）Trends in Plant Science 5：446－451）。「ベクター」は、異なる宿主細胞間での移行のために設計されたポリヌクレオチドコンストラクトを指す。「発現ベクター」は、異質な細胞内に異種性のDNA配列または断片を取り入れ、組み込み、かつ発現させることのできるベクターを指す。

【0116】

植物形質転換ベクターは、植物を形質転換させるための、1以上のDNAベクターを含む。例えば1を超える連続したDNAセグメントを含む植物形質転換ベクターを利用することは、当該技術分野において一般に実践されている。これらのベクターは当該技術分野においてしばしばバイナリーベクターと称される。バイナリーベクターおよびヘルパープラスミドを含むベクターは、効率的な形質転換を達成するために必用なDNAセグメントの大きさおよび複雑さが極めて大きな場合に、アグロバクテリウムを介した形質転換において最もよく使用されており、これらは別々のDNA分子上に機能を分けることが有利である。バイナリーベクターには、典型的にはT－DNA移行に必用なシス作用配列（例えば左境界および右境界）を含むプラスミドベクター、植物細胞内で発

59

現可能なように改変された選択性マーカー、および「関心のあるポリヌクレオチド」（トランスジェニック植物の作製が望まれる植物細胞において発現可能なように改変されたポリヌクレオチド）が含まれる。このプラスミドベクターには、細菌の複製に必用な配列も存在する。シス作用配列は、効率的な植物細胞内への移行およびそこでの発現が可能となるように配列される。例えば、選択性マーカー配列および関心のある配列は、左境界と右境界との間に配置される。第２のプラスミドベクターには、しばしばアグロバクテリウムから植物細胞へのＴ－ＤＮＡ移行を仲介するトランス作用因子が含まれる。当該技術分野において理解されるように、このプラスミドには、しばしばアグロバクテリウムによる植物細胞の感染、ならびに境界配列における切断によるＤＮＡの移行およびｖｉｒ仲介性のＤＮＡ移行を可能にする毒性因子（Ｖｉｒ遺伝子）が含まれる（Ｈｅｌｌｅｎｓ ａｎｄ Ｍｕｌｌｉｎｅａｕｘ（２０００）Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ，５：４４６－４５１）。幾つかの型のアグロバクテリウム株（例えばＬＢＡ４４０４、ＧＶ３１０１、ＥＨＡ１０１、ＥＨＡ１０５など）が、植物を形質転換させるために用いられ得る。第２のプラスミドベクターは、顕微鏡投影法、微量注入法、エレクトロポレーション、ポリエチレングリコールなどのようなその他の方法によって植物内にポリヌクレオチドを導入する場合には必用でない。

【０１１７】

Ｆ．植物の形質転換

本発明の方法は、植物内へヌクレオチドコンストラクトを導入することに関わる。「導入する」は、ヌクレオチドコンストラクトが植物細胞の内部へ接近可能な様式において、該コンストラクトを植物に提示することを意図する。本発明の方法では、植物にヌクレオチドコンストラクトを導入するために特別の方法を用いることは必用とされず、ヌクレオチドコンストラクトが植物の少なくとも一つの細胞の内部へ接近可能であることのみが必要とされる。植物内へヌクレオチドコンストラクトを導入するための方法は当該技術分野において公知であり、安定形質転換法、一過性形質転換法、およびウイルスを介した方法が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第４，４５９，３５５号、米国特許第４，５３６，４７５号、米国特許第５，４６４，７６３号、米国特許第５、１７７，０１０号、米国特許第５，１８７，０７３号、欧州特許第２６７，１５９Ａ１号、欧州特許第６０４６６２Ａ１号、欧州特許第６７２７５２Ａ１号、米国特許第４，９４５，０５０号、米国特許第５，０３６，００６号、米国特許第５，１００，７９２号、米国特許第５，３７１，０１４号、米国特許第５，４７８，７４４号、米国特許第５，１７９，０２２号、米国特許第５，５６５，３４６号、米国特許第５，４８４，９５６号、米国特許第５，５０８，４６８号、米国特

60

許第５，５３８，８７７号、米国特許第５，５５４，７９８号、米国特許第５，４８９，５２０号、米国特許第５，５１０，３１８号、米国特許第５，２０４，２５３号、米国特許第５，４０５，７６５号、欧州特許第４４２１７４Ａ１号、欧州特許第４８６２３３Ａ１号、欧州特許第４８６２３４Ａ１号、欧州特許第５３９５６３Ａ１号、欧州特許第６７４７２５Ａ１号、国際公開第９１／０２０７１号、国際公開第９５／０６１２８号、および国際公開第号２０１１／０９５４６０号に記載される植物細胞の形質転換法および植物の再生法を参照されたい。これらの文献それぞれは、特にこれらに記載される形質転換法に関して、参照により本明細書に取り込まれる。

【０１１８】

一般に植物の形質転換法は、異種性のＤＮＡを標的植物細胞（例えば未熟または成熟胚、懸濁培養、未分化のカルス、プロトプラストなど）内へ移行させ、続いて最大閾値濃度での適切な選択を行って（選択性マーカー遺伝子にしたがって）、非形質転換細胞集団の群から形質転換した植物細胞を回収することを含む。外植体は、典型的には補給した新鮮な同培地中に移した後、日常的に培養される。次に形質転換細胞を、最大閾値濃度の選択薬剤を加えた再生培地中に移した後、シュートへと分化させる。続いてシュートを選択性の発根培地に移し、根付いたシュートまたは小植物を回収する。トランスジェニック小植物は、次に成熟植物へと成長し、稔性の種子を産生する（例えばＨｉｅｉ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ ６：２７１－２８２；Ｉｓｈｉｄａｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：７４５－７５０）。外植体は、典型的には補給した新鮮な同培地中に移した後、日常的に培養される。トランスジェニック植物を産出するための技術および方法についての一般的記述は、Ａｙｒｅｓ ａｎｄ Ｐａｒｋ（１９９４）Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎＰｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ １３：２１９－２３９およびＢｏｍｍｉｎｅｎｉ ａｎｄ Ｊａｕｈａｒ（１９９７）Ｍａｙｄｉｃａ ４２：１０７－１２０に見出される。形質転換した材料には多くの細胞が含まれることから、標的とされたカルス、または組織、または細胞群のいずれかの部分には、形質転換および非形質転換細胞の両方が存在する。

非形質転換細胞を死滅させ、かつ形質転換細胞の増殖を可能にする能力により、形質転換された植物の培養が可能となる。非形質転換細胞を除去する能力はしばしば、形質転換された植物細胞の迅速な回収およびトランスジェニック植物産出の成功に対する制限となる。分子的および生化学的方法は、トランスジェニック植物のゲノム内に組み込まれた、関心のある異種性遺伝子の存在を確認するために用いることができる。

61

【０１１９】
トランスジェニック植物の産出は、限定はされないが、アグロバクテリウムによる植物細胞内への異種性ＤＮＡの導入（アグロバクテリウムを介した形質転換）、粒子に付着した異種性の外来ＤＮＡを用いた、植物細胞への微粒子銃の使用、およびその他の様々な非粒子性の直接法（例えばＨｉｅｉ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ ６：２７１－２８２；Ｉｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：７４５－７５０；Ａｙｒｅｓ ａｎｄ Ｐａｒｋ（１９９４）Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ１３：２１９－２３９；Ｂｏｍｍｉｎｅｎｉ ａｎｄ Ｊａｕｈａｒ（１９９７）Ｍａｙｄｉｃａ ４２：１０７－１２０）を含む、ＤＮＡを移行させるための幾つかの方法のうちの一つによって行われてよい。

【０１２０】
葉緑体の形質転換方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Ｓｖａｂ ｅｔａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：８５２６－８５３０；Ｓｖａｂ ａｎｄ Ｍａｌｉｇａ（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：９１３－９１７；Ｓｖａｂ ａｎｄ Ｍａｌｉｇａ（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：６０１－６０６を参照されたい。該方法は、選択性マーカーを含むＤＮＡの微粒子銃による送達、および相同組換えを通した、色素体ゲノムへのＤＮＡのターゲティングを利用するものである。加えて、色素体の形質転換は、核においてコードされ、かつ色素体に方向付けられたＲＮＡポリメラーゼの組織優先的な発現による、サイレント色素体由来の導入遺伝子のトランス活性化によって達成され得る。このようなシステムは、ＭｃＢｒｉｄｅ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：７３０１－７３０５に報告されている。

【０１２１】
形質転換された細胞は、従来法に従って植物へと成長し得る。例えば、ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５：８１－８４を参照されたい。これらの植物は、成長した後、同じ形質転換株または異なる株によって授粉し、所望の表現型の特性を恒常的に発現するハイブリッドが同定され得る。２世代以上の成長によって所望の表現型の特性の発現が安定的に維持、かつ継承されることが確実になり、次に種子が収穫されることで所望の表現型の特性の発現が達成されたことが確実となる。このように本発明は、本発明のヌクレオチドコンストラクト、例えば本発明の発現カセットをそのゲノム内に安定的に取り込んだ、形質転換された種子（「トランスジェニック種子」とも称される）を提供する。様々な実施形態によれば

62

、種子は、少なくとも１の抗真菌剤および／または少なくとも１の殺虫剤、少なくとも１の除草剤および／または少なくとも１の毒性緩和剤、またはそれらのいずれかの組み合わせによってコートされてよい。

【０１２２】
Ｇ．植物の形質転換の評価
植物細胞内への異種性の外来ＤＮＡの導入に従い、形質転換または植物ゲノム内への異種性遺伝子の組み込みが、組み込まれた遺伝子に関連する核酸、タンパク質、および代謝産物の分析のような、様々な方法によって確認される。

【０１２３】
ＰＣＲ分析は、土壌に移植する前の早い段階で、形質転換細胞、組織、またはシュート内に取り込まれた遺伝子の存在を迅速にスクリーニングする方法である（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ））。ＰＣＲは、関心のある遺伝子またはアグロバクテリウムベクターのバックグラウンドなどに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われる。

【０１２４】
植物の形質転換は、ゲノムＤＮＡのサザンブロット分析によって確認され得る（上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１））。一般には形質転換体から全ＤＮＡを抽出し、適切な制限酵素で消化した後にアガロースゲルにて分画し、ニトロセルロースまたはナイロンメンブレンに転写する。メンブレンまたは「ブロット」に対しては、次に、標準的な技術（上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，２００１）に従い、例えばプローブとして^{32}Ｐにより放射性標識した標的ＤＮＡ断片を用いることで、植物ゲノム内へ導入した遺伝子の取り込みを確認する。

【０１２５】
ノーザンブロット分析においては、形質転換体の特定の組織からＲＮＡを分離し、ホルムアルデヒドアガロースゲルにて分画した後、当該技術分野において日常的に用いられる標準的な手順（上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１））に従ってナイロンフィルター上にブロットする。次に、当該技術分野において公知の方法（上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１）に従って、フィルターをＧＤＣ由来の放射性プローブとハイブリダイズすることにより、本発明のヌクレオチド配列がコードするＲＮＡの発現を試験する。

【０１２６】
除草剤耐性タンパク質に存在する１以上のエピトープに結合する抗体を用いた標準的な手順（上記のＳａｍｂｒ

63

ｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１））に従うことで、トランスジェニック植物に対してウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、ラテラルフロー試験、および生化学アッセイなどを行い、除草剤に対する耐性遺伝子によってコードされるタンパク質の存在を決定する。

【０１２７】

本発明の一態様によれば、本明細書に記載されるＨＰＰＤ遺伝子は、細菌または植物細胞の形質転換を評価するためのマーカーとして有用である。

【０１２８】

Ｈ．形質転換に対するマーカーとしての使用

本発明はまた、植物の形質転換法における、本発明のＨＰＰＤをコードする核酸のマーカー遺伝子としての、またはＨＰＰＤ阻害剤である除草剤への耐性を植物に付与し得るコード配列としての使用、および本発明のＨＰＰＤをコードする核酸配列を含む植物における１以上のＨＰＰＤ阻害剤の使用に関する。例えば、その全体が参照により本明細書に取り込まれる米国特許第６，７９１，０１４号を参照されたい。

【０１２９】

この実施形態では、コンピテント植物細胞が形質転換工程の前に白化するように、前記細胞の培地中にＨＰＰＤ阻害剤を添加する。白化したコンピテント細胞を、次に、選択マーカーとしてのＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子によって形質転換した後、前記選択マーカーがゲノム内に組み込まれた形質転換細胞は緑となることから、選択が可能となる。

このような方法により、形質転換細胞を選択するために必要な時間が短縮され得る。

【０１３０】

このように本発明の一実施形態は、異種性遺伝子と、選択マーカーとしてのＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性遺伝子とを共に植物細胞内に導入することによって前記植物細胞を形質転換させるための方法からなり、該方法は、適切な培地中で異種性遺伝子を受け入れることのできるコンピテント植物細胞を調製および培養すること、およびコンピテント植物細胞の適切な培地中に適切な量のＨＰＰＤ阻害剤を添加することを含む。次にコンピテント細胞を異種性遺伝子および選択マーカーによって形質転換した後、異種性遺伝子を含む形質転換細胞を適切な培地中で成長させて、そこから形質転換体を選択する。形質転換細胞は、次に稔性の形質転換植物へと再生させることができる。

【０１３１】

Ｉ．植物および植物の部分

「植物」は、植物全体、植物器官（例えば葉、茎、根など）、種子、植物細胞、繁殖体、胚およびその子孫を意図する。植物細胞は分化していてよいか、または未分化（例えばカルス、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉細胞、根細胞、師部細胞、花粉）であってよい。本発明は

64

、単子葉植物および双子葉植物を含むがこれらに限定されない、いずれかの植物種へのポリヌクレオチドの導入のために用いられてよい。関心のある植物の例としては、トウモロコシ（ｍａｉｚｅ）、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、アブラナ、アブラナ属の種、アルファルファ、ライムギ、アワ、ベニバナ、ピーナッツ、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナツ、パイナップル、柑橘類、ココア、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、カラスムギ類、野菜類、装飾花類、および針葉樹類が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３２】

野菜類としては、トマト、レタス、緑豆、ライマメ、エンドウマメ、ならびにキュウリ属のメンバー、例えばキュウリ、カンタループ、およびマスクメロンが挙げられるが、これらに限定されない。装飾花としては、ツツジ、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、ラッパズイセン、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、およびキクが挙げられるが、これらに限定されない。農作物植物にもまた関心がもたれるが、例えば、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、アブラナなどが挙げられる。

【０１３３】

本発明は、トウモロコシ、米、オオムギ、カラスムギ類、コムギ、モロコシ、ライムギ、パイナップル、ヤムイモ、タマネギ、バナナ、ココナツ、およびデーツを含むが、これらに限定されない単子葉植物ファミリーのいずれかのメンバーに適している。

【０１３４】

Ｊ．植物の収穫高を増大させる方法

植物の収穫高を増大させる方法が提供される。該方法は、本発明のＨＰＰＤをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む植物を提供することまたは該ポリヌクレオチドを植物もしくは植物細胞内に導入すること、該植物またはその種子を耕作地において成長させること、および前記植物または種子を収穫することを含む。本明細書で定義される植物の「収穫高」は、植物によって生じる現存量の品質および／または量を指す。

「現存量」は、計測されたいずれかの植物産物を意図する。生じる現存量の増大は、計測された植物産物の収穫高における何らかの改善を意味する。植物収穫高の増大により、幾つかの商業的応用が為される。例えば植物葉現存量の増大により、ヒトまたは動物が消費するための葉菜の収穫高が増大し得る。加えて、葉現存量の増大は、植物由来の医薬品または工業製品の産生を増大させる

65

ために利用可能である。収穫高の増大は統計的に有意ないずれかの増大を含んでよく、限定はされないが、少なくとも１％の増大、少なくとも３％の増大、少なくとも５％の増大、少なくとも１０％の増大、少なくとも２０％の増大、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも７０％、少なくとも１００％、またはそれを超える増大が挙げられる。

【０１３５】

特定の方法では、本発明のＨＰＰＤ配列を含む植物は、有効濃度のＨＰＰＤ除草剤、例えばＮ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類の分類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤からなる群より選択される１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤によって処理され、除草剤の使用によって植物の収穫高は改善される。

【０１３６】

植物または植物の部分に、除草剤に対する耐性を付与する方法もまた提供される。このような方法では、本発明のＨＰＰＤをコードするヌクレオチド配列が植物内に導入され、ポリヌクレオチドの発現によってＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性がもたらされる。この方法によって産生された植物は、有効濃度の除草剤（例えばＮ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤からなる群より選択される１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤）によって処理可能であり、除草剤に対する耐性の増大を示す。本出願における除草剤の「有効濃度」は、除草剤に対して自然に耐性ではなく。また耐性を付与されてもいない植物または植物の部分の成長を遅延または停止させるために十分な量である。

66

【０１３７】

Ｋ．耕作地における雑草の防除方法

したがって本発明は、不要な植物の防除または本発明のＨＰＰＤをコードするヌクレオチド配列を含む農作物植物の成長を調節するための方法にも関し、該方法においては、例えば、Ｎ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類の分類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、またはメソトリオンから選択される１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤が、植物（例えば単子葉類もしくは双子葉類の雑草または不要な農業植物のような有害植物）、種子（例えば穀物、種子、または、塊茎または芽を有するシュート部分のような野菜の繁殖体）、または植物が成長する区域（例えば栽培区域）へ適用される。これに関連して、例えばＮ（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類の分類、Ｎ－（テトラゾール－４－イル）－またはＮ－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－Ｎ－（１－メチル－１Ｈ－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるＨＰＰＤ阻害除草剤からなる群より選択される１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤の有効濃度を、例えば植え付け前（土壌への取り込みもまた適切である場合に）、発芽前または発芽後に使用する

67

ことができ、かつ農作物が自然に耐性であるか、または１以上のその他の除草剤抵抗性の導入遺伝子の発現を通して抵抗性となるその他の除草剤と併用してもよい。例えば米国特許出願公開第２００４／００５８４２７号およびＰＣＴ出願国際公開第９８／２０１４４号を参照されたい。「有効濃度」は、ＨＰＰＤ阻害剤に耐性の植物または植物種子に有意に影響することなく、雑草またはその他の非形質転換植物の成長または拡散を制御する濃度を意図する。当業者は、除草剤の使用が多くの異なった形態をとり得ること、ならびに種子の植え付けおよび成長過程に先立ち、および／またはそれらの間を通して、様々な時間において起こり得ることを理解する。「発芽前」使用は、植物の土壌からの発芽が目に見える前の、関心のある区域（例えば耕作地または栽培区域）での除草剤の使用を指す。「発芽後」使用は、植物の土壌からの発芽が目に見えた後の、区域での除草剤の使用を指す。幾つかの例では、「発芽前」および「発芽後」の用語は関心のある区域における雑草に関して用いられ、幾つかの例では、これらの用語は関心のある区域内の農業植物に関して用いられる。雑草に関して用いられる場合、これらの用語は、関心のある区域に存在するか、または存在すると考えられる雑草または種の特定の型に対して用いられ得る。除草剤の「植え付け前の取り込み」は、植え付け前の化合物の土壌中への取り込みに関する。

【０１３８】

このように、本発明は耕作地における雑草を防除するための方法を含み、該方法は、本発明のＨＰＰＤを含む植物またはその種子を耕作地に植え付けること、および前記植物または前記植物の周囲の区域に、１以上のＨＰＰＤ阻害除草剤を有効濃度にて使用することを含む。

【０１３９】

本発明の一実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む植物（例えば大豆、綿、トウモロコシ、またはコムギ植物）を植え付けた耕作地は、植物を植え付けるか、または種子をまく前に、イソキサフルトール（ＩＦＴ）のようなＨＰＰＤ阻害除草剤によって処理してよく、ＨＰＰＤ阻害剤によって雑草が死滅することで、耕作地は耕す必要なくきれいになり、続いて、前処理されたこの耕作地に植物の植え付けまたは種まきが行われる（ＨＰＰＤ阻害除草剤を用いた、焼き払いの応用）。ＩＦＴの残余の活性も、初期の成長段階で、植物の発芽および成長を雑草との競合から保護し得る。植物がいったんある大きさになり、雑草が再びみられるようになると、グルホシネートまたはグリホサート、またはＨＰＰＤ阻害剤、またはＨＰＰＤ阻害剤と別の除草剤、例えばグリホサートとの混合物が、このような植物が前記除草剤に対して耐性の場合に、発芽後の除草剤として植物の上部から使用できる。

【０１４０】

本発明の別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む種子がまかれた耕作地は、種子がまかれた後ではあるが、植物が発芽する前に、ＩＦＴのようなＨＰＰＤ阻害除草剤によって処理することができる（耕作地は、種まきの前にその他の手段、典型的にはプラウ、チゼル・プラウ、または播床の準備のような従来の耕作の実践によって雑草の無い状態にすることができる）が、耕作地では除草剤によって死滅した雑草の無い状態が残余の活性によって維持され、出芽および成長する植物と雑草とが競合しない（ＨＰＰＤ阻害除草剤の発芽前使用）。植物がいったんある大きさになり、雑草が再びみられるようになると、グルホシネートまたはグリホサート、またはＨＰＰＤ阻害剤、またはＨＰＰＤ阻害剤と別の除草剤、例えばグリホサートとの混合物が、このような植物が前記除草剤に対して耐性の場合に、発芽後の除草剤として植物の上部から使用できる。

【０１４１】

本発明の別の実施形態によれば、本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む植物は、まかれた種子から出芽した植物の上部からＨＰＰＤ阻害除草剤によって処理することができ、ＨＰＰＤ阻害剤によって雑草が死滅することで、耕作地は耕す必要なくきれいになるが、ＨＰＰＤ阻害剤は、植物の上部から使用する発芽後除草剤としてのグリホサートまたはグルホシネートと共に（例えばスプレータンク内で混合して）、グリホサートまたはグルホシネートによる処理の後または前に、植物がこのような除草剤に対して耐性である場合に使用可能である（ＨＰＰＤ阻害除草剤（単独またはグリホサートとの併用）の発芽後使用）。

【０１４２】

ＨＰＰＤ阻害除草剤によって防除可能な、代表的な単子葉類および双子葉類の雑草それぞれの例としては、

単子葉類有害植物の属としてエギロプス属(Aegilops)、カモジグサ属(Agropyron)、コヌカグサ属(Agrostis)、スズメノテッポウ属(Alopecurus)、セイヨウヌカボ属(Apera)、カラスムギ属(Avena)、ビロードキビ属(Brachiaria)、スズメノチャヒキ属(Bromus)、クリノイガ属(Cenchrus)、ツユクサ属(Commelina)、ギョウギシバ属(Cynodon)、カヤツリグサ属(Cyperus)、タツノツメガヤ属(Dactyloctenium)、メヒシバ属(Digitaria)、ヒエ属(Echinochloa)、ハリイ属(Eleocharis)、オヒシバ属(Eleusine)、スズメガヤ属(Eragrostis)、ナルコビエ属(Eriochloa)、ウシノケグサ属(Festuca)、テンツキ属(Fimbristylis)、アメリカコナギ属(Heteranthera)、チガヤ属(Imperata)、カモノハシ属(Ischaemum)、アゼガヤ属(Leptochloa)、ドクムギ属(Lolium)、ミズアオイ属(Monochoria)、キビ属(Panicum)、スズメノヒエ属(Paspalum)、クサヨシ属(Phalaris)、アワガエリ属(Phleum)、イチゴツナギ属(Poa)、ツノアイアシ属(Rottboellia)、オモダカ属(Sagittaria)、ホタルイ属(Scirpus)、セタリア属(Setaria)、モロコシ属(Sorghum)が挙げられ、

69

双子葉類雑草の属としてアブチロン属(Abutilon)、アマランサス属(Amaranthus)、ブタクサ属(Ambrosia)、アノダ属(Anoda)、ローマカミツレ属(Anthemis)、イワムシロ属(Aphanes)、ヨモギ属(Artemisia)、ハマアカザ属(Atriplex)、ヒナギク属(Bellis)、センダングサ属(Bidens)、ナズナ属(Capsella)、ヒレアザミ属(Carduus)、センナ属(Cassia)、ヤグルマギク属(Centaurea)、アカザ属(Chenopodium)、アザミ属(Cirsium)、セイヨウヒルガオ属（Convolvulus)、チョウセンアサガオ属(Datura)、ヌスビトハギ属(Desmodium)、イヌスイバ属(Emex)、エゾスズシロ属(Erysimum)、トウダイグサ属(Euphorbia)、チシマオドリコソウ属(Galeopsis)、コゴメギク属(Galinsoga)、ヤエムグラ属(Galium)、フヨウ属(Hibiscus)、サツマイモ属(Ipomoea)、ホウキギ属(Kochia)、オドリコソウ属(Lamium)、マメグンバイナズナ属(Lepidium)、アゼナ属(Lindernia)、シカギク属(Matricaria)、ハッカ属(Mentha)、ヤマアイ属(Mercurialis)、ザクロソウ属(Mullugo)、ワスレナグサ属(Myosotis)、ケシ属(Papaver)、アサガオ属(Pharbitis)、オオバコ属(Plantago)、タデ属(Polygonum)、スベリヒユ属(Portulaca)、キンポウゲ属(Ranunculus)、ダイコン属(Raphanus)、イヌガラシ属(Rorippa)、キカシグサ属(Rotala)、ギシギシ属(Rumex)、オカヒジキ属(Salsola)、キオン属(Senecio)、ツノクサネム属(Sesbania)、キンゴジカ属(Sida)、シロガラシ属(Sinapis)、ナス属(Solanum)、ノゲシ属(Sonchus)、ナガボノウルシ属(Sphenoclea)、ハコベ属(Stellaria)、タンポポ属(Taraxacum)、グンバイナズナ属(Thlaspi)、シャジクソウ属(Trifolium)、イラクサ属(Urtica)、クワガタソウ属(Veronica)、スミレ属(Viola)、オナモミ属(Xanthium)が挙げられる。

【０１４３】

限定はされないが、例としてN（１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）ベンズアミド類の分類、N－（テトラゾール－４－イル）－またはN－（トリアゾール－３－イル）アリールカルボキサミド類、例えば２－クロロ－３－エトキシ－４－（メチルスルホニル）－N－（１－メチル－１H－テトラゾール－５－イル）ベンズアミドおよび２－クロロ－３－（メトキシメチル）－４－（メチルスルホニル）－N－（１－メチル－１H－テトラゾール－５－イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンであるＨＰＰＤ阻害除草剤が挙げられる、本発明において有用なＨＰＰＤ阻害除草剤は、主な生物学的および／または物理化学的パラメータに依存して、様々な方法で処方することができる。可能な処方の例としては

70

、水和剤（ＷＰ）、水溶剤（ＳＰ）、水溶性濃縮製剤、乳剤（ＥＣ）、エマルション（ＥＷ）、例えば水中油エマルションおよび油中水エマルション、スプレー溶液、懸濁濃縮製剤（ＳＣ）、油または水ベースの分散剤、油混和性溶液、カプセル懸濁液（ＣＳ）、ダスト剤（ＤＰ）、種子粉衣産物、広範囲の土壌に使用するための顆粒、微粒剤の形態である顆粒（ＧＲ）、スプレー顆粒、コートされた顆粒および吸着顆粒、水和性顆粒（ＷＧ）、水溶性顆粒（ＳＧ）、ＵＬＶ製剤、マイクロカプセル、およびワックスが挙げられる。

【０１４４】

これらの処方の個々の型は原則的には公知であり、例えばWinnacker－Kuchler,“Chemische Technologie”[Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986;Wade van Valkenburg,“Pesticide Formulations”, Marcel Dekker, N. Y., 1973;K. Martens,“Spray Drying”Handbook, 3rd Ed. 1979, G. Goodwin Ltd. Londonに記載されている。

【０１４５】

必要とされる不活性材料、界面活性剤、溶媒、およびさらなる添加物のような処方用の助剤もまた公知であり、例えばWatkins,“Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers”, 2nd Ed., Darland Books, Caldwell N. J., H. v. Olphen,“Introduction to Clay Colloid Chemistry”;2nd Ed., J. Wiley & Sons, N. Y.;C. Marsden,“Solvents Guide”;2nd Ed., Interscience, N. Y. 1963;McCutcheon’s“Detergents and Emulsifiers Annual”, MC Publ. Corp., Ridgewood N. J.;Sisley and Wood,“Encyclopedia of Surface Active Agents”, Chem. Publ. Co. Inc., N. Y. 1964;Schonfeldt,“Grenzflachenaktive Athylenoxidaddukte”[Interface−active ethylene oxide adducts], Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976;Winnacker−Kuchler,“Chemische Technologie”[Chemical technology], volume 7, C. Ha

71

ｎｓｅｒ Ｖｅｒｌａｇ Ｍｕｎｉｃｈ，４ｔｈ Ｅｄ．１９８６に記載されている。

【０１４６】

これらの処方に基づき、その他の駆除用活性剤、例えば、殺虫剤、ダニ駆除剤、除草剤、抗真菌剤と共に、かつ毒性緩和剤、肥料および／または制御因子と共に、例えば調合済またはタンク混合の形態で併用物を調製することも可能である。

【０１４７】

Ｌ．別の植物への本発明の遺伝子の導入方法

本明細書では、別の植物への本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列の導入方法も提供される。本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列またはその断片は、反復選択、戻し交雑、系統育種、系統選択、集団選択、変異育種、および／または高感度遺伝子マーカー選択によって第２の植物へ導入することができる。

【０１４８】

このように一実施形態によれば、本発明の方法は、本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む第１の植物と、第２の植物とを交雑してＦ１子孫植物を産出すること、および、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む、Ｆ１子孫植物を選択することを含む。該方法は選択した子孫植物と、本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む第１の植物とを交雑して、戻し交雑による子孫植物を産出すること、および、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む、戻し交雑子孫植物を選択することをさらに含んでもよい。ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を評価する方法は、本明細書の他所に記載される。該方法は、これらの工程を１回以上連続的に反復し、ＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のＨＰＰＤヌクレオチド配列を含む、選択された第２の、またはそれを超える戻し交雑子孫植物を産出することをさらに含んでもよい。

【０１４９】

本発明の方法では、所望の表現型についての植物の選択に関与する、いずれかの育種法を用いることができる。幾つかの実施形態によれば、Ｆ１植物は、分離されたＦ２世代を産出するために自家受粉されてもよい。次に、所望の表現型（例えばＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性）を呈する個々の植物を、各世代（Ｆ３、Ｆ４、Ｆ５など）において、該形質がホモ接合性となるかまたは育種集団内部で固定されるまで選択してよい。

【０１５０】

第２の植物は、除草剤耐性、昆虫耐性、乾燥耐性、線虫防除された、効率良い水使用、効率良い窒素使用、改善された栄養値、疾病抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された再生などのような所望の形質を有する植物であってよい。第２の植物は、本明細書の他所に記載するエリート体であってもよい。

72

【０１５１】

様々な実施形態によれば、植物の部分（植物全体、植物器官（例えば葉、茎、根など）、種子、植物細胞、繁殖体、胚など）は、得られた交雑体から収穫されてよく、それに由来する使用（例えば食品、食餌、生物燃料、油、小麦粉、穀粉など）のために、繁殖させるかまたは収集される。

【０１５２】

Ｍ．植物産物を得るための方法

本発明はまた、商品を得るための過程にも関し、該過程は、本発明のＨＰＰＤ配列を含む農作物由来の穀物を収穫および／または製粉して商品を得ることを含む。農学的および商業的に重要な産物および／または物質組成物として、限定はされないが、ヒトが消費する食品としての使用が意図されたか、またはヒトが消費する組成物および物品における使用が意図された、動物用の餌、物品、および植物産物、ならびに副生成物、特に、失活した穀物／種子から産生された（半）処理製品を含む、失活した種子／穀物製品が挙げられ、前記産物は、全体のまたは処理された種子または穀物、動物用の餌、コーンミールまたは大豆かす、トウモロコシ粉または大豆粉、トウモロコシ、コーンスターチ、大豆かす、大豆粉、フレーク、大豆かすタンパク質濃縮物、大豆タンパク質分離物、組織化大豆タンパク質濃縮物、化粧品、毛髪手入れ用品、大豆バター、納豆、テンペ、加水分解大豆タンパク質、ホイップトッピング、ショートニング、レシチン、食用丸大豆（生の、ローストした、または枝豆としての）、大豆ヨーグルト、大豆チーズ、豆腐、湯葉、および調理した、脱穀した、蒸した、焼いた、または半ゆでにした穀物などであるか、またはこれらを含むものであり、これらの産物および物質組成物が、このようなヌクレオチド配列を含むいずれかの植物の特徴として、本明細書に示すヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列を検出可能な量含む場合、これらの産物および物質組成物は本発明の範囲内にあることが意図される。

【０１５３】

以下の実施例は例証を目的とするものであり、限定を目的とするものではない。

【０１５４】

実施例

実施例１：蛍光菌(Pseudomonas fluorescens)ＨＰＰＤ変異体Ｇ３３６Ｗ（ＰｆＧ３３６Ｗ）の調製およびＨＰＰＤ酵素の動態特性決定

本明細書に配列番号１として示され、かつ国際公開第２００９１４４０７９号、国際公開第９６／３８５６７号、およびＲｕｅｔｓｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２０５，４５９－４６６，１９９２）にも記載されるアミノ酸配列をコードする、天然の蛍光菌ＨＰＰＤヌクレオチド配列（国際公開第２００９

73

１４４０７９号に記載されるＰｆＨＰＰＤ、１０７７ｂｐ）を、まず開始コドンを提供する発現ベクターｐＫＫ２３３－２（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）に固有のＮｃｏＩ部位にクローン化した。

【０１５５】

５’末端において、ＡＴＧのすぐ下流にアラニンアミノ酸をコードする核酸配列およびN末端ＨＩＳ６－Ｔａｇ（ｃａｔ ｃａｃ ｃａｔ ｃａｃ ｃａｔ ｃａｃによりコードされる６×ＨＩＳ（配列番号７７））をコードする核酸配列を挿入した。ＡＴＧの上流には、制限酵素ＮｃｏＩの認識部位に対応する配列を得るために二つのさらなるシステインの塩基対を加え、終止コドンの下流には制限酵素Ｘｂａｌの認識部位に対応する配列を加えた。ＨＩＳ－ＴＡＧをコードする配列を含む、遺伝子に対応するＤＮＡ配列を制限酵素ＮｃｏＩおよびＸｂａＩによって切断した後、改変した発現ベクターｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ（５２６１ｂｐ）内へクローン化した。

【０１５６】

クローニングおよび発現ベクターｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ（５２６１ｂｐ）は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（カールスルーエ、独国）のプラスミドｐＳＥ４２０に基づくものである。このベクターの改変には、抗生物質カナマイシンへの耐性を付与し、大部分のスーパーリンカー領域（マルチクローニング部位）を有さないｎｐｔＩＩ遺伝子（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ（Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ））の付加が含まれる。

【０１５７】

該プラスミドは、ｔｒｐ－ｌａｃ（ｔｒｃ）プロモーター、およびすべての大腸菌宿主株にｌａｃリプレッサーを供給するｌａｃｌ^{q}遺伝子を有する。ｌａｃリプレッサーはｌａｃオペレーター（ｌａｃＯ）に結合して標的遺伝子の発現を制限するが、この阻害は、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を用いた誘導によって減少させることができる。

【０１５８】

得られたベクターをｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ－ＰｆＨＰＰＤと称し、大腸菌ＢＬ２１細胞（Ｍｅｒｃｋ、ダルムシュタット、独国）を形質転換するために用いた。

【０１５９】

プラスミドｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ－ＰｆＨＰＰＤを、ＰＣＲを介した部位特異的変異誘発に供し、ＰｆＨＰＰＤ遺伝子の対応部位において規定されたコドンを変化させた。

位置３３６のグリシン（Ｇ）をコードするコドンを、トリプトファン（Ｗ）をコードするコドンによって置換した。得られた変異体をＰｆＧ３３６Ｗと称し、ベクター

74

ｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ－ＰｆＧ３３６Ｗを得た。

【０１６０】

ｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ－ＰｆＨＰＰＤまたはｐＳＥ４２０（ＲＩ）ＮＸ－ＰｆＧ３３６Ｗを含む大腸菌Ｋ－１２　ＢＬ２１内でＨＰＰＤを発現させた。ＯＤが０．５に達するまで細胞を増殖させ、次に、ｌａｃリプレッサーに結合して、そのｌａｃオペロンからの解離を引き起こす１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いた誘導によって、ｔｒｐ－ｌａｃ（ｔｒｃ）プロモーターからの発現を開始させた。発現は２８℃にて１５時間行った。

【０１６１】

前スターター培養液を調製するため、２ｍＬのＴＢ培地（１００μｇ＊ｍＬ$^{-1}$のカルベニシリン）に５０μＬの大腸菌Ｋ－１２　ＢＬ２１グリセロールストックを植菌した。

前スターター培養液を１４０ｒｐｍで振盪しながら３７℃にて１５時間インキュベートした。２００μ１の前培養液を用いてスターター培養（１００μｇ＊Ｌ$^{-1}$のを加えた５ｍＬのＴＢ）を開始し、３７℃にて３時間インキュベートした。

【０１６２】

メイン培養液を調製するため、４００ｍＬのＴＢ培地（１００μｇ＊ｍＬ$^{-1}$のカルベニシリン）に４ｍＬのスターター培養液を植菌した。このスターター培養液を１４０ｒｐｍで振盪しながら３７℃にてOD_{600}が０．５になるまでインキュベートした。次に４００μｌの１Ｍ　ＩＰＴＧ溶液を加えて組換えタンパク質の発現を誘導した。細胞をこのような条件下でさらに増殖させた後、温度を２８℃に低下させて、培養液を１４０ｒｐｍで１５時間振盪した。細胞を６０００×ｇ、１５分間４℃にて遠心分離することにより回収した。次に細胞ペレットを－８０℃にて保管した。

【０１６３】

<u>未変性His_6－ＰｆＨＰＰＤおよびHis_6－ＰｆＧ３３６Ｗの分離ならびに精製</u>

<u>細胞の溶解</u>

細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン中のＮ－アセチルムラミン酸とＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミン残基との間の１，４－β結合を切断する酵素であるリゾチームを用いて、細胞を溶解した。次に細菌細胞の内圧によって細胞膜を破壊した。加えて、タンパク質を損傷させることなくすべての型のＤＮＡおよびＲＮＡを加水分解するエンドヌクレアーゼであるベンゾナーゼ（登録商標）ヌクレアーゼを含む溶解緩衝液を用いて、細胞ライセートの粘度を大きく低下させた。未変性状態の溶解は、氷上で行った。ＱＩＡＥＸＰＲＥＳＳ（登録商標）Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｆａｓｔ　Ｓｔａｒｔ　キットをユーザーマニュアルの指示に従って用いることで、His_6－タグ化タンパク質を精製した。

【０１６４】

75

固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）によるＨｉｓ$_6$－タグ化タンパク質の精製

溶解反応の遠心分離後に得た清澄な細胞ライセート（１０ｍＬ）をＱＩＡＥＸＰＲＥＳＳ（登録商標）Ｎｉ－ＮＴＡ Ｆａｓｔ Ｓｔａｒｔ キットのＮｉ－ＮＴＡ ＦａｓｔＳｔａｒｔ カラム（Ｑｉａｇｅｎ、ヒルデン、独国）に負荷し、取扱説明書に従って精製した。Ｈｉｓ$_6$－タグ化タンパク質を、２．５ｍＬの溶出緩衝液によって溶出した。

【０１６５】

ゲル濾過によるＨＰＰＤ溶液の脱塩

２．５ｍＬの溶出緩衝液によってＮｉ－ＮＴＡ Ｆａｓｔ Ｓｔａｒｔ カラムから溶出したＨＰＰＤ溶液を、ユーザーマニュアルの指示に従ってＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５ＰＤ－１０カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、フライブルク、独国）にアプライした。ゲル床に全試料を入れた後、３．５ｍＬの保存緩衝液によって溶出した。

【０１６６】

脱塩カラムから溶出したＨＰＰＤ溶液を、１ｍＬの一定分量で、－８０℃にて凍結した。

【０１６７】

ブラッドフォードタンパク質アッセイを用いたＨＰＰＤタンパク質濃度の決定

標準的なブラッドフォードアッセイ（Ｂｒａｄｆｏｒｄ，（１９７６），Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ７２：２４８－２５４）を用いてタンパク質濃度を決定した。

【０１６８】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いたＨＰＰＤ溶液の純度の決定

ゲルNUPAGE（登録商標）Ｎｏｖｅｘ ４～１２％ビス－トリスゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カールスルーエ、独国）を用いたＳＤＳ－ＰＡＧタンパク質ゲル電気泳動によって、溶出したタンパク質の完全性を調べ、おおよそ約１０μｇのタンパク質を負荷した。１～１０μｌのタンパク質溶液に１０μｌのレムリサンプルバッファーを加え、混合物を９０℃にて１０分間インキュベートした。短い遠心分離工程の後、全混合物を、ＮＵＰＡＧＥ（登録商標）ＭＯＰＳ ＳＤＳランニングバッファー（２０×溶液からｄｄＨ$_2$Ｏによって希釈した）を満たしたＸＣＥＬＬ ＳＵＲＥＬＯＣＫ（商標）Ｎｏｖｅｘ Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌ ｇｅｌ ｃｈａｍｂｅｒ内で予め固定化したＳＤＳゲルのスロット内へ負荷した。ゲルチャンバーに１５０ボルテージを１時間適用した。タンパク質バンドを染色するため、クマシーブリリアントブルー Ｒ－２５０染色液中にゲルを浸した。ポリアクリルアミドゲルの脱染のため、これをクマシーブリリアントブルー Ｒ－２５０脱染液中に、白いゲルに青のタンパク質バンドが現れるまで浸した。

【０１６９】

実施例２：ＨＰＰＤ酵素であるＰｆＨＰＰＤおよびＰｆＧ３３６Ｗの動態特性およびＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性

76

標準的な分光光度アッセイ（その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第２００９／１４４０７９号に記載される）によって、ＨＰＰＤ活性を調べた。

【０１７０】

ＨＰＰＤのｉｎ ｖｉｔｒｏにおける動態特性の決定

ＨＰＰＤ活性を測定するためにＨＰＬＣアッセイを用い、異なるＨＰＰＤ酵素調製物についてはK_m、V_{max}、およびk_{cat}値を、および異なるＨＰＰＤ阻害剤についてはK_i、$K_I = K_{on}$、および$K_I = K_{off}$を決定したか、または決定することができる。１ｍｌの１５０ｍＭ トリス－ＨＣｌ緩衝液 ｐＨ７．８中のアッセイ混合物には、１０ｍＭ アスコルビン酸ナトリウム、６５０単位のウシカタラーゼ（Ｓｉｇｍａ Ｃ３０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ミュンヘン、独国）、３４ｍｇタンパク質／ｍｌ、２３，０００単位／ｍｇ）、ならびに適切な量のＨＰＰ、精製ＨＰＰＤ酵素、およびＨＰＰＤ阻害剤が含まれる。K_m、V_{max}、およびk_{cat}値を決定するために、アッセイ混合物中のＨＰＰ濃度は１０ないし４００μＭに変動した。K_i、$K_I = K_{on}$、および$K_I = K_{off}$値を決定するために、２ｍＭ ＨＰＰを使用したか、または使用することができる。すべてのアッセイは、アッセイ混合物へのＨＰＰＤ酵素の添加によって開始し、０ないし２４０秒の一連の時間に、２００μｌの反応混合物を、２０μｌの１０％過塩素酸を含む反応アッセイ管内に加えることによって終了した。沈殿したタンパク質は、１０，０００ｇにて５分間遠心分離することによってペレット化した。１００μｌの上清を、１０％メタノール、０．１％トリフルオロ酢酸（緩衝液Ａ）によって平衡化した２５０×４ｍｍ Ｋｎａｕｅｒ（ベルリン、独国）Ｅｕｒｏｓｐｈｅｒ １００－５ Ｃ１８カラムに負荷した。カラムは、緩衝液Ａによる４分間の洗浄、続いて９５％メタノールによる３分間の洗浄、および緩衝液Ａによるさらなる２分間の洗浄を用いて、１．５ｍｌ／分で溶出した。ＨＧＡ（ホモゲンチジン酸）およびＨＰＰ（ヒドロキシフェニルピルビン酸）の溶出を、２９２ｎｍにてモニターした。ＨＧＡは５分あたりで溶出し、ＨＰＰはそれよりも遅く溶出した。ＨＧＡ濃度に対するＨＧＡピークの２９２ｎｍにおける吸光度を較正するため、ＨＧＡ濃度の標準的な一組を用いて検量線を描いた。

【０１７１】

K_mおよびV_{max}値を決定するために、ＩＤ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ Ｌｔｄ．（ｗｗｗ．ｉｄｂｓ．ｃｏｍ）ＸＬｆｉｔソフトウェアスイートを用いて、異なる基質濃度におけるＨＰＰＤ反応の初速度を、生成したＨＧＡの時間に対するプロットから決定した後、定常反応状態の酵素に対するミカエリス・メンテン式に適用した。K_i、$K_I = K_{on}$、および$K_I = K$

77

$_{off}$値を決定するために、異なる阻害剤濃度におけるＨＰＰＤ反応の経時変化を、ＩＤ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ Ｌｔｄ．ＸＬｆｉｔソフトウェアスイートを用いて、強固に結合した阻害剤に対する競合阻害である機序Ａについての方程式（Ｃｈａ，Ｓ．（１９７５）Ｔｉｇｈｔ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ－１．Ｋ$_{i}$ｎｅｔｉｃ ｂｅｈａｖｉｏｕｒ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ２４，２１７７－２１８５）に適用した。

【０１７２】

表１：ＨＰＰＤ酵素（ＰｆＨＰＰＤおよびＰｆＧ３３６Ｗ）の動態特性

下の表１に示す「Ｋ$_{m}$」（ミカエリス・メンテン定数）は、酵素の性質決定に用いられる動態パラメータを意味し、反応の最大速度の半分の速度をもたらす基質濃度として定義される。Ｋ$_{m}$はさらに、反応速度がその最大値の半分（Ｖ$_{max}$／２）に達する際の基質濃度として定義され、ここではＶ$_{max}$が反応の最大速度を意味する。

【０１７３】

Ｋ$_{on}$＝Ｋ$_{1}$は、酵素－基質の結合の会合速度定数を表し、Ｋ$_{off}$＝Ｋ$_{1}$は、酵素－阻害剤複合体の解離の速度定数を表す。Ｋ$_{i}$は阻害定数を表す。酵素の特異的活性を決定するために、試料をインキュベートして、反応を２４分後に停止させた。特異的活性をタンパク質のμｇによって推定した。

【０１７４】

【表１】

	HPP	HPP	特異的活性
	K_m (μM)	Kcat (s^{-1})	ΔE/24 分 μg タンパク質
PfHPPD	187	4.4	0.76
PfG336W	141	5.4	0.40

【０１７５】

表１は、野生型細菌ＨＰＰＤ（ＰｆＨＰＰＤ）と変異ＨＰＰＤ（ＰｆＧ３３６Ｗ）との間で、動態パラメータであるＫ$_{m}$およびＫ$_{cat}$に有意差は見られなかったことを示す。

しかしながら変異体では、野生型タンパク質に比較して特異的活性が有意に低下している。

【０１７６】

数種のＨＰＰＤ阻害剤の存在下での、ＨＰＰＤ活性の決定

これに関連して、ｐＩ$_{50}$値は、モル濃度での、酵素活性の５０％を阻害するために必要な阻害剤濃度のｌｏｇ値を表す。

【０１７７】

ＨＰＰＤ阻害剤に対するｐＩ$_{50}$値は、国際公開第２００９／１４４０７９号に詳細に記載される、２mMに固定したＨＰＰ濃度および３分間に固定したインキュベーション時間によるアッセイを行い、ＩＤ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ Ｌｔｄ．ＸＬｆｉｔソフトウェアスイートを用いて作成した、阻害剤濃度に対するＨＰＰＤ活性の用量反応プロットから決定した。

78

【０１７８】

分光光度法を用いてＰｆＨＰＰＤおよびＰｆＧ３３６Ｗ酵素のｐＩ$_{50}$を測定した。以下に挙げる幾つかのＨＰＰＤ阻害剤、テンボトリオン、ジケトニトリル、メソトリオンに対する耐性を測定した。記号「＞」は、値が表示するものよりもはるかに大きかったが、試験した阻害剤の濃度の範囲内（５．０×１０$^{-6}$、１．０×１０$^{-5}$、２．５×１０$^{-5}$、４．０×１０$^{-5}$、７．０×１０$^{-5}$、１．０×１０$^{-4}$、２．０×１０$^{-4}$、および５．０×１０$^{-4}$Ｍ）では正確に算出できなかったことを意味する。本実験において、読み取りは実験開始の２４分後に行った。結果を表２に示す。

【０１７９】

【表２】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	>5.6	>5.6	>5.6
PfG336W	>5.6	4.9	5.3

【０１８０】

ＨＰＰＤ酵素のｐＩ$_{50}$もまた、ＨＰＬＣに基づいた方法を用いて測定した。ＨＰＰＤ阻害剤であるテンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する耐性を測定した。本実験において、測定は実験開始の３分後に行った。結果を表３に示す。

【０１８１】

【表３】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	4.9	4.7	4.7
PfG336W	4.6	4.2	4.3

【０１８２】

ＨＰＰＤ活性、およびＨＰＰＤ阻害剤に対するＨＰＰＤ耐性を測定する別の方法では、全量１ｍｌ中に２００ｍＭ トリス－ＨＣｌ ｐＨ７．６、１０mM アスコルビン酸塩、２０μＭ ＦｅＳＯ$_{4}$、６５０単位のカタラーゼ、８μｇ ＨＧＡジオキシゲナーゼ（ＨＧＡ：ホモゲンチジン酸）、および１０～１００μＭ ＨＰＰを含む溶液中に、適切な量のＨＰＰＤを加えることによって、室温にてＨＰＰＤ活性を測定した。反応初速度は、マレイルアセト酢酸の生成による、３１８ｎｍにおける吸光度の増大から決定した（ε$_{318}$＝１１，９００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）。Ｋ$_{m}$およびＶ$_{max}$値は、ＩＤ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ Ｌｔｄ Ｘｌｆｉｔバージョン５．１．０．０ソフトウェアスイートのモデ

79

ル３５０を用いて、異なるＨＰＰ濃度において決定したＨＰＰターンオーバーの初速度をミカエリス・メンテン式に適用することによって決定した。この方法はＨＧＤアッセイと称される。

【０１８３】

ＨＰＰＤ酵素のｐＩ$_{50}$もまた、ＨＰＰＤ共役アッセイを用いて測定し（ＨＧＤ；ＰｆＨＰＰＤおよびＰｆＧ３３６Ｗ）、ＨＰＰＤ阻害剤であるテンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する、それぞれの耐性を測定した。結果を表４に示す。

【０１８４】

【表４】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	6.4	5.8	5.8
PfG336W	6.0	5.3	5.3

【０１８５】

表２、３、および４では、蛍光菌由来のＨＰＰＤの位置３３６における変異により、数種のＨＰＰＤ阻害剤に対するＨＰＰＤの耐性が有意に増大したことが明らかである。

【０１８６】

実施例３：第一世代の点変異体ライブラリー

ＰｆＧ３３６Ｗ変異体の位置１６をさらに変異させた。これらの位置の無作為化は、ＱＵＩＫＣＨＡＮＧＥＲ ｌｉｇｈｔｎｉｎｇキットを用いて行った。ライブラリーの理論上の多様性は約３００であった。変異体をプールして、ＤＨ５アルファ大腸菌細胞を形質転換した。個別の６００クローンについて、ＨＰＰＤ阻害剤であるテンボトリオン（ＴＢＴ）に対する耐性をスクリーニングした。クローンは、カナマイシンを加えたＬＢ培地中で、３７℃の振盪機内にてＯＤ６００ｎｍが０．３に達するまで増殖させた。次に培養を３０℃に切り換え、さらに１７時間インキュベートした。培養液を遠心分離した後、細胞ペレットを１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ／ＫＯＨ ｐＨ７．６、４ｍＭ $MgCl_2$、１ｍＭ ＤＴＴ中に再懸濁させた。ビーズ破砕によって細胞を溶解し、遠心分離後に可溶性の細胞抽出物を得た。

【０１８７】

変異体は、茶色アッセイ（ｂｒｏｗｎ ｃｏｌｏｒ ａｓｓａｙ）を用いて分析した。

具体的には、９６ウェルフォーマット内で、ＬＢ寒天、カナマイシン、５ｍＭ チロシン、４２ｍＭ コハク酸塩、およびＨＰＰＤ阻害剤を含む固形培地上にＨＰＰＤ抽出物をスポットすることにより、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性をアッセイした。最初のスクリーニングでは、２５０μＭのテンボトリオンを含むプレート上に、２０μｌの抽出物を三通りにスポットした。プレートをａｉｒｐｏｒｅ ｔａｐｅで覆い、３７℃にてインキュベートした。２４時間後、ＰｆＧ３３６Ｗを含む試料と比較して、茶色色素の生成を視覚的に観察した。ＴＢＴの存在下で色素の生成を増大させた変異体を、２５０μＭ ＴＢＴ、およびイソキサフルトール（ＩＦＴ）の２５０μＭ ジケトニトリル（ＤＫＮ）活性化合物によって再アッセイした。再び阻害剤耐性の改善を示したそれらの変異形を再び発現させ、改善の範囲を決定するために、抽出物の用量を２５０μＭ ＴＢＴおよび２５０μＭ ＤＫＮにおいて漸増させた。抽出物試料に対してはＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析も行い、含まれるＨＰＰＤタンパク質の量が等しいことを確認した。

80

【０１８８】

用量の漸増により、変異形ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３３（配列番号６）のＴＢＴおよびＤＫＮに対する耐性は、ＰｆＧ３３６Ｗに比較して４倍改善されていることが示された。この変異形では、ＰｆＧ３３６Ｗに比較すると、位置３３５のグルタミン酸がプロリンに置換されている。この変異は、活性部位へのゲートとして作用するｃ末端のアルファヘリックスに位置する。

【０１８９】

実施例４：第二世代置換ライブラリーのスクリーニング

最初に生成した変異形のうち最良の作用を示した変異形の配列を解析し、位置３３５、３３６、３３９、３４０を組み合わせた領域において、第二世代置換ライブラリーを作製した。このライブラリーの理論上の多様性は約６４０であった。実施例３に記載したように、スクリーニングを行った。位置１８８、１８９、および１９０を標的とする、別の第二世代置換ライブラリーを作製し、茶色アッセイ（ｂｒｏｗｎ ｃｏｌｏｒ ａｓｓａｙ）を用いて測定した。

【０１９０】

用量を漸増したデータにより、変異形ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３６（配列番号７）のＴＢＴおよびＤＫＮに対する耐性は、ＰｆＧ３３６Ｗに比較して１６倍改善されていることが示された。ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３３に比較した場合では、該耐性は４倍改善されていた。再びタンパク質発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析すると、変異形が発現するＨＰＰＤタンパク質の量は等しいことが確認された。ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３６では、ＰｆＧ３３６Ｗに比較すると、位置３３５のグルタミン酸がセリンに置換され、位置３３６のトリプトファンがセリンに置換され、位置３３９のリジンがスレオニンに置換され、かつ位置３４０のアラニンがグルタミンに置換されている。

【０１９１】

用量を漸増したデータにより、変異形ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３７（配列番号３）のＴＢＴおよびＤＫＮに対する耐性は、ＰｆＧ３３６Ｗに比較して改善されていることが示された。ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ３７では、ＰｆＧ３３６Ｗに比較すると、位置１８８のアラニンがトリプトファンに置換されている。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析を行うと、変異形の間でＨＰＰＤの発現量に違いは無いこと

が確認された。

【０１９２】

用量を漸増した以下のデータは、変異形ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４０（配列番号８）のＴＢＴおよびＤＫＮに対する耐性が、ＰｆＧ３３６Ｗに比較して改善されていることを示している。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析を行うと、変異形の間でＨＰＰＤの発現量に違いは無いことが確認された。

【０１９３】

変異体はまた、ＨＰＰＤを発現する大腸菌細胞全部を様々なＨＰＰＤ阻害剤を含む培地にまくことによっても試験した。このような実験のために、ＨＰＰＤの発現プラスミドを含むＤＨ５アルファ細胞を、ＬＢ培地＋カナマイシン中でＯＤ６００ｎｍ＝０．５に達するまで増殖させた。０．０１６、０．００８、０．００４、および０．００２のＯＤ６００値に対応するように、細胞をＬＢ培地＋カナマイシン中で連続希釈した。それぞれの希釈液の１０マイクロリットルを、ＨＰＰＤ阻害剤を含まないか、または２５０μＭ　ＴＢＴ、２５０μＭ　ＤＫＮ、または２５０μＭ　メソトリオン（ＭＳＴ）を含むプレートに三通りにまいた。プレートを３７℃にて１８時間インキュベートした。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析を行うと、変異形の間でＨＰＰＤの発現量に違いは無いことが確認された。

【０１９４】

このアッセイでは、ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４０およびＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４１（配列番号１６）のＴＢＴおよびＭＳＴに対する耐性が、ＰｆＧ３３６Ｗに比較して改善されていることが示された。

【０１９５】

実施例５：置換変異体の酵素的な分析

ＰｆＨＰＰＤ酵素の動態活性を幾つかの置換変異体と比較した結果を、以下の表５に示す。「K_m」（ミカエリス・メンテン定数）は、酵素の性質決定に用いられる動態パラメータを意味し、反応の最大速度の半分の速度をもたらす基質濃度として定義される。K_m はさらに、反応速度がその最大値の半分（V_{max}／２）に達する際の基質濃度として定義され、ここではV_{max}が反応の最大速度を意味する。

【０１９６】

酵素の特異的活性を決定するために、試料をインキュベートして、反応を２４分後に停止させた。特異的活性をタンパク質のμｇによって推定した。

【０１９７】

【表５】

	HPP	HPP	配列番号
	K_m (μM)	Kcat (s^{-1})	
PfHPPD	187	4.4	1
PfG336W	141	5.4	2
PfHPPDEvo37	220	3.0	3
C023E6	424	6.9	4
C024H11	188	0.8	5
PfHPPDEvo33	581	2.3	6
PfHPPDEvo36	602	3.3	7
PfHPPDEvo40	509	3.2	8
CO210d10	1181	1.4	9
CO212f3	297	0.9	10
C644	232	0.5	11
C645	156	0.8	12
c0216C6	1541	1.2	14
c0213H10	489	2.6	15
PfHPPDEvo41	336	1.1	16

【０１９８】

分光光度法を用いて、蛍光菌ＨＰＰＤ（ＰｆＨＰＰＤ）およびその変異体に由来するＨＰＰＤの特異的活性を測定した。試料をインキュベートして、反応を２４分後に停止させた。特異的活性をタンパク質のμｇによって推定した。

【０１９９】

【表６】

HPPD	特異的活性(デルタ吸光度/24分/μgタンパク質)	配列番号
PfHPPD	0.76	1
PfG336W	0.4	2
PfHPPDEvo37	0.36	3
C023E6	0.38	4
C024H11	0.07	5
PfHPPDEvo33	0.25	6
PfHPPDEvo36	0.82	7
PfHPPDEvo40	0.42	8
CO210d10	0.43	9
CO212f3	0.42	10
C644	0.38	11
C645	0.36	12
c0218A5	0.13	13
c0216C6	0.50	14
c0213H10	0.51	15
PfHPPDEvo41	0.44	16
C0228G9	0.17	17
C0232D2	0.06	18
C0234A4	0.33	19
C0235F6	0.53	20
C0235E2	0.34	21
C0236H7	0.36	22
C0236F8	0.47	23
C0240D2	0.32	24
C0240D12	0.29	25
C0242D4	0.21	26
C0244A2	0.25	27
C0244F5	0.22	28
C0247B6	0.37	29

83

C0247H7	0.28	30
C0252F11	0.26	31
C0255B12	0.21	32
C0255C1	0.17	33
C0255C3	0.19	34
C0255E6	0.15	35
C0255E10	0.24	36
C0256B1	0.31	37
C0256G11	0.33	38
C0256H4	0.19	39
C0257C5	0.3	40
C0260E11	0.79	41
C0260C6	0.51	42
C0262C4	0.81	43
C0262F11	0.76	44
C0263B7	0.43	45
C0263G12	0.77	46
C0261H2	0.42	47
C0264G5	0.71	48
C0264G7	0.35	49
C0266A11	0.33	50

【０２００】
表６に示すように、酵素の野生型と大半の変異体との間に活性の有意差はみられなかった。したがって、観察された耐性は酵素に固有の特性であり、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸のホモゲンチジン酸への変換の機能障害または活性の遅延によるものではないと考えられる。
【０２０１】
ジケトニトリル（イソキサフルトールの活性型）およびメソトリオンに対する耐性もまた、分光光度アッセイを用いて測定した。値はpI_{50}を表す。「＞」は、値がこのアッセイの測定範囲外であることを意味する（例えば、酵素がその後に示す値よりもさらに感受性であった場合）。
【０２０２】
【表７】

84

HPPD	pI_{50} ジケトニトリル	pI_{50} メソトリオン
	OD	OD
PfHPPD	>5.6	>5.6
PfG336W	4.9	5.3
PfHPPDEvo37	4.7	5.3
C023E6	4.4	5.5
C024H11	4.1	4.6
PfHPPDEvo33	4.3	5.1
PfHPPDEvo36	4.5	n.d.
PfHPPDEvo40	3.5	4.9
CO210d10	4.3	5.7
CO212f3	4.7	5.4
C644	5.3	>5.6
C645	>5.6	>5.6
c0218A5	4.4	5.1
c0216C6	4.0	4.9
c0213H10	4.9	5.2
PfHPPDEvo41	3.4	4.7
C0228G9	5.4	5.7
C0232D2	5.1	5.5
C0234A4	4.9	>5.6
C0235F6	4.7	5.5
C0235E2	4.7	5.4
C0236H7	4.7	5.3
C0236F8	4.9	>5.6
C0240D2	4.9	5.4
C0240D12	4.5	5.0
C0242D4	3.6	4.5
C0244A2	4.7	5.6
C0244F5	4.3	5.3

C0247B6	5.1	>5.6
C0247H7	4.4	5.2
C0252F11	3.7	4.6
C0255B12	4.0	5.0
C0255C1	3.6	4.7
C0255C3	4.8	5.5
C0255E6	3.7	4.4
C0255E10	4.8	>5.6
C0256B1	5.0	>5.6
C0256G11	4.9	5.5
C0256H4	3.6	4.8
C0257C5	3.8	4.6
C0260E11	4.7	5.4
C0260C6	4.6	5.3
C0262C4	4.8	5.3
C0262F11	5.0	5.5
C0263B7	4.1	4.6
C0263G12	4.9	5.6
C0261H2	4.5	5.3
C0264G5	4.9	5.6
C0264G7	4.1	4.8
C0266A11	4.0	4.9

【０２０３】
テンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトールの活性型）、およびメソトリオンに対する耐性もまた、ＨＰＬＣに基づいたアッセイを用いて測定した。値はpI_{50}を表す。「＞」は、値がこのアッセイの測定範囲外であることを意味する（例えば、酵素がその後に示す値よりもさらに感受性であった場合）。

85

【０２０４】
【表８】

HPPD	pI_{50} テンボトリオン	pI_{50} ジケトニトリル	pI_{50} メソトリオン
	HPLC	HPLC	HPLC
PfHPPD	4.9	4.7	4.7
PfG336W	4.6	4.2	4.3
PfHPPDEvo37	4.1	3.6	n.d.
C023E6	4.3	3.5	n.d.
C024H11	4.8	4.0	n.d.
PfHPPDEvo33	5.2	3.6	n.d.
PfHPPDEvo36	5.2	4.2	n.d.
PfHPPDEvo40	5.0	3.2	n.d.
CO210d10	5.9	3.9	n.d.
CO212f3	4.8	3.8	n.d.
C644	5.5	4.5	5.1
C645	5.2	4.7	5.1
c0218A5	5.0	3.7	4.6
c0216C6	4.8	3.1	4.2
c0213H10	4.5	3.4	4.3
PfHPPDEvo41	4.9	3.4	n.d.
C0228G9	4.6	4.2	4.2
C0232D2	n.d.	n.d.	n.d.
C0234A4	5.0	n.d.	n.d.
C0235F6	5.0	n.d.	n.d.
C0235E2	4.9	n.d.	n.d.
C0236H7	5.1	n.d.	n.d.
C0236F8	4.9	n.d.	n.d.
C0240D2	4.8	n.d.	n.d.
C0240D12	4.9	n.d.	n.d.

【０２０５】
表８に示すように、幾つかのＨＰＰＤ変異体が、テンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトール）、およびメソトリオンそれぞれに対して耐性の改善を示した。
【０２０６】
選択したＨＰＰＤ変異体の、テンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する耐性もまた、ＨＰＰＤ共役アッセイ（実施例２に記載される）を用いて測定した。
値はpI_{50}を表す。
【０２０７】
【表９】

HPPD	pI_{50} テンボトリオン	pI_{50} ジケトニトリル	pI_{50} メソトリオン	Km (μM)	配列番号
	HGD	HGD	HGD		
PfHPPD	6.4	5.8	5.8	187	1
PfG336W	6.0	5.3	5.5	141	2
PfHPPDEvo33	6.2	4.6	5.5	581	6
PfHPPDEvo40	6.2	4.2	4.8	509	8
PfHPPDEvo41	5.6	4.2	4.3	336	16

【０２０８】
表９に示すように、試験したいずれのＨＰＰＤ阻害剤に対しても、ＨＰＰＤ変異体は野生型ＨＰＰＤ酵素に比較して耐性であった。このように本発明には、有意に改善された耐性を幾つかのＨＰＰＤ阻害剤に対して同時に示す、変異ＨＰＰＤ酵素が含まれる。

86

【０２０９】
表１０に挙げるＨＰＰＤ酵素については、国際公開第２０１２／０２８５７９号（その全体が、特に本明細書の表１０に記載される化合物に関して参照により本明細書に取り込まれる）に記載される分類の、その他のＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性も測定した。耐性は、上記のＨＰＰＤ共役アッセイ（ＨＧＤ）を用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏにて推定した。値はpI_{50}を表す。
【０２１０】
【表１０】

	pI50 (HGD アッセイ)	
	国際公開第２０１２／０２８５７９号において規定される化合物番号４～２５３	国際公開第２０１２／０２８５７９号において規定される化合物番号４～２７８
PfG336W	6.2	6.6
PfHPPD	6.4	5.9
PfHPPDEvo40	5.5	6.1
PfHPPDEvo41	5.4	5.6

【０２１１】
このように、選択された変異体は広範囲のＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を示した。
【０２１２】
<u>実施例６：植物体における、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性の分析</u>
グリホサートに対する耐性を付与する遺伝子およびグルホシネートに対する耐性を付与する遺伝子と共に本発明のＨＰＰＤ阻害剤耐性酵素を発現する大豆植物の、テンボトリオンに対する耐性を試験した。各スプレーの前に、ＤｅＶｒｉｅｓ　Ｔｒａｃｋｅｒ　Ｓｐｒａｙｅｒを較正した。テンボトリオンを試験するために用いた化学製剤は、ＬＡＵＤＩＳ（登録商標）ＳＣ製剤であった。スプレー試験は、１８４グラム／ヘクタール、３４．５％　ＴＢＴを用いて行った。スプレー後１週間目に耐性を評価した。「＋」の評価は、活発に成長する組織において完全に白化した植物に割り当てた。「＋＋」の評価は、わずかに耐性がみられた植物、すなわち最も新しい植物組織はある程度緑であり、完全には白化していない植物に割り当てた。「＋＋＋」の評価は、スプレーによる効果が非常に少なかった植物、すなわちある程度の白化または非常にわずかな白化がみられた植物に割り当てた。これらの試験の結果を表１１に示す。
【０２１３】
【表１１】

87

HPPD	処理した植物の数	+	++ または +++	++ または +++ のパーセント
PfG336W	2248	811	160	7.12
PfHPPDEvo37	35	17	3	8.57
PfHPPDEvo33	151	50	54	35.76
PfHPPDEvo40	207	60	65	31.4
PfHPPDEvo41	852	412	279	32.75
PfHPPDEvo36	88	47	18	20.45

【０２１４】

ＰｆＧ３３６ＷおよびＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４１の発現体（それぞれがグリホサートに対する耐性を付与する遺伝子およびグルホシネートに対する耐性を付与する遺伝子も発現する）を耕作地での試行によって評価した。植物には、ｖ２～ｖ３段階において１×グルホシネートをスプレーした。グルホシネートによる処理後５日目に、生存した植物に２×テンボトリオン、２×メソトリオン、または２×イソキサフルトールをスプレーし、７日後に植物毒性を評価した。ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４１を発現する１８体のうち９体、およびＰｆＧ３３６Ｗを発現する１８体のうち０体が、テンボトリオンを２００ｇ　ａｉ／ｈａにて発芽後に使用した際の２０％の平均植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

【０２１５】

アルゼンチンの耕作地における試行では、１０体のＴ２　ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４１のうち５体、および３体のＰｆＧＷ３３６のうち１体が、イソキサフルトールを２１０ｇ　ａｉ／ｈａにて発芽後に使用した際の１８％の最大植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

【０２１６】

米国（ミネソタ州）で行った耕作地における試行では、７体のＴ２　ＰｆＨＰＰＤＥｖｏ４１のうち７体、および１１体のＰｆＧＷ３３６のうち１体が、テンボトリオンを２００ｇ　ａｉ／ｈａにて発芽後に使用した際の２５％の最大植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

【０２１７】

実施例７：その他のＨＰＰＤ酵素変異体の作製

ＨＰＰＤ活性がピンク／オレンジ色として視覚的に検出可能なアッセイを用いて、ＡＴＸ２２７１７株およびＡＴＸ１９７４株を同定した。アッセイの感度を改善するため、キノン抑制剤を取り込ませた。キノン抑制剤としては、ＭＢＴＨまたは３－メチル－２－ベンジソチアゾリノンヒドラジンを用いた。フェノール酸化酵素およびＨＰＰＤの両方は、中間体産物としてキノン化合物を産生するジオキシゲナーゼ酵素であり、これらのキノンは迅速かつ自発的に電子再構成を行って、さらに安定な下流産物、例えばメラニン（フェノール酸化酵素の場合）またはホモゲンチジン酸（ＨＰＰＤの場合）を形成し、不溶性となる。キノンと複合する場合、ＭＢＴＨ－キノン産物がピンク／オレンジ色となる。ＭＢＴＨ抑制剤の添加によって、アッセイの感度がおおよそ５倍に増大する。

88

【０２１８】

株はＬＢ寒天中でおおよそ２４時間増殖させた。細胞を遠心分離によってペレット化し、１／２量の２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液　ｐＨ７．１に再懸濁した後、ビーズ破砕によって溶解した。５０μｌの株抽出物を、円錐底９６ウェルブロック内の、１５０μｌのＭＢＴＨアッセイ混合液に加えた。最終的なアッセイ混合物には、１０ｍＭ　ＭＢＴＨ、０または１ｍＭ　ヒドロキシフェニルピルビン酸（ＨＰＰ）、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液ｐＨ７．１、および０、１０μＭまたは１ｍＭ　テンボトリオン（ＴＢＴ）が含まれた。スコア化の前に、９６ウェルアッセイブロックを、床型振盪機内で、３０℃、２００ｒｐｍにておおよそ２２時間振盪した。ＡＴＸ２２７１７株およびＡＴＸ１９７４株はＴＢＴに対する耐性を示した。

【０２１９】

ＡＴＸ２２７１７株は、米国ノースカロライナ州の土壌試料から分離した緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)株である。

【０２２０】

ＡＴＸ１９７４株は、米国ノースカロライナ州の土壌試料から分離したシュードモナス・アガリシ株(Pseudomonas agarici)である。

【０２２１】

以下の工程を用いて、株からＨＰＰＤ遺伝子を同定した。

・株からの全ＤＮＡの調製。全ＤＮＡにはゲノムＤＮＡおよび染色体外ＤＮＡの両方が含まれる。染色体外ＤＮＡは、様々な大きさのプラスミド、ファージ染色体、および特性が明らかではないその他の染色体外分子のうちの幾つかまたは全部の混合物を含む。

・ＤＮＡの配列決定。次世代シーケンシング法によって全ＤＮＡの配列決定を行う。

・Ｎｅｗｂｌｅｒ、ｐｈｒｅｄＰｈｒａｐｍ、およびＣＬＣを含む様々なソフトウェアプログラムによるＤＮＡ配列の構築。

・ＤＮＡおよびタンパク質の相同性アルゴリズムによるＨＰＰＤ遺伝子の同定。

【０２２２】

Ａｘｍｉ３０５ＨはＡＴＸ２２７１７株から同定された。Ａｘｍｉ３０５Ｈをコードするヌクレオチド配列は配列番号６０に示され、アミノ酸配列は配列番号５７に示される。

Ａｘｍｉ３０５Ｈは、米国特許出願公開第２００７００２０６２４号の配列番号２９６９６に対して９９．７％同一である。

【０２２３】

89

Ａｘｍｉ３０９ＨはＡＴＸ１９７４株から同定された。Ａｘｍｉ３０９Ｈをコードするヌクレオチド配列は配列番号６１に示され、アミノ酸配列は配列番号５８に示される。Ａｘｍｉ３０９Ｈは、ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）受託番号ＹＰ＿３４８６４８に対して９９．７％同一である。

【０２２４】

コマモナス・テストステローニ(Comamonas testosteroni)株は、ＨＰＰＤ活性の産物としてのホモゲンチジン酸の誘導体であるピオメラニンを産生すると報告されていることから（Ｔｕｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ Ｆｉｅｌｄ Ｄｅｐｌｏｙｍｅｎｔ Ｒｅｐｏｒｔ．ＷＳＲＣ－ＴＲ－２００５－００４５５）、酵素的に好ましいＨＰＰＤの潜在的な源として選択した。

【０２２５】

ＢＬＡＳＴ公開データベースの検索により、細菌種コマモナス・テストステローニには二つの異なるＨＰＰＤが存在することが示された。一つは長さが３６２アミノ酸であり、もう一つは長さが３７３アミノ酸である。ＢＬＡＳＴデータベースに見出される、コマモナス・テストステローニ株であるＣＮＢ－２、ＫＦ－１、およびＳ４４の報告済のヌクレオチド配列に基づき、二つのＨＰＰＤ遺伝子それぞれに対して設計したプライマーを用いて、コマモナス・テストステローニゲノムＤＮＡ（ＡＴＣＣＲカタログ番号７００４４１）をＰＣＲ増幅した。

【０２２６】

ＰＣＲ産物をＢｓｐＨＩおよびＸｂａＩによって消化し、ＮｃｏＩおよびＸｂａＩによって切断したｐＳＥ４２０内にクローン化した。

【０２２７】

ＢＬＡＳＴサーチによれば、長さが３７３アミノ酸のＨＰＰＤの、ヌクレオチド配列および由来するアミノ酸配列は、報告されているコマモナス・テストステローニＨＰＰＤのいずれの配列とも一致しないが、コマモナス・テストステローニＳ４４とは９９％同一である。以後、この新規配列をＡｘｍｉ４２８Ｈと称する。Ａｘｍｉ４２８Ｈをコードするヌクレオチド配列を配列番号６２に示し、アミノ酸配列を配列番号５９に示す。

【０２２８】

活性のあるＨＰＰＤ酵素はヒドロキシフェニルピルビン酸をホモゲンチジン酸に変換することから、茶色の色素であるピオメラニンを生成する。この色素の生成は可視化することができる。Ａｘｍｉ４２８Ｈタンパク質を発現するＤＨ５アルファ細胞を、ＬＢ培地中で飽和状態に増殖させた後、１０μｌの飽和培養液を、０、０．５、１．０、および２．０ｍＭのテンボトリオンを含む１００μｌのＬＢ寒天プレート上にスポットした。細胞を３７℃にておおよそ１６時間さらに増殖させた後、写真撮影を行った。

90

【０２２９】

ホモゲンチジン酸１，２－ジオキシゲナーゼ（ＨＧＯ）酵素によるホモゲンチジン酸の産生に関連するｉｎ ｖｉｔｒｏ動態アッセイを用いて、Ａｘｍｉ４２８Ｈを動態的にも特徴付けた。ＨＧＯはホモゲンチジン酸をマレイルアセト酢酸に変換するが、これは３２１ｎｍにおいてみられる強い吸収によってモニターされる。９６ウェル分光光度計により、限定された濃度から飽和濃度まで変化させた基質の存在下で、産物のリアルタイムでの産生を継続的にモニターすることで、標準的なミカエリス・メンテン速度式を用いた酵素のK_mの決定が可能になる。様々な濃度の阻害剤テンボトリオンの存在下でのK_mの変化をグラフにすることにより、K_iの決定が可能になる。

【０２３０】

このアッセイのために、形質転換したＤＨ５アルファ細胞を２５０ｒｐｍ、３７℃にて振盪しながら、培養液のＯＤ６００が０．６～０．７に達するまで増殖させることによってＡｘｍｉ４２８Ｈ酵素を調製した。次に温度を３０℃に低下させ、培養液をおおよそ２０時間振盪し続けた。細胞培養液を遠心分離によってペレットにした後、１／２０量の２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．０、５０ｍＭ ＮａＣｌ緩衝液に再懸濁した。細胞にＬＹＳＯＮＡＳＥ（商標）（Ｎｏｖａｇｅｎ）を加えて４５分間室温で溶解させた後、－２０℃にて少なくとも１時間凍結した。細胞抽出物をアッセイの直前に融解し、遠心分離によって清澄にした後、様々な濃度の基質および阻害剤、ならびに過剰のＨＧＯ酵素の存在下で活性を測定した。動態データの分析によって得られた動態定数を以下の表に示す。テンボトリオンに対するＡｘｍｉ４２８Ｈの耐性は変異ＰｆＧ３３６Ｗ遺伝子と同等であり、両方の耐性は未変性の大豆ＨＰＰＤよりも高かった。

【０２３１】

【表１２】

遺伝子	Km HPP (μM)	Vmax	Ki TBT (μM)
大豆 HPPD	32.5	79	0.04
W336	152	35	2.49
Axmi428H	52	22.6	1.37

【０２３２】

本明細書に記載する変異ＨＰＰＤ酵素の幾つかに存在する変異を、Ａｘｍｉ３０５Ｈ、Ａｘｍｉ３０９Ｈ、およびＡｘｍｉ４２８Ｈを含むその他の未変性のＨＰＰＤ酵素の対応する位置に導入することで、これら酵素の耐性の改善を試みた。

【０２３３】

異なるＨＰＰＤタンパク質間の配列同一性を表１３に示す。アラインメントはＡｌｉｇｎＸを用いて行った。

【０２３４】

【表１３】

91

	PfG336W	Axmi309H	Axmi428H	Axmi305H
PfG336W	100	94	56	53
Axmi309H	94	100	56	54
Axmi428H	56	56	100	54
Axmi305H	53	54	54	100

【０２３５】

ベクターｐＳＥ４２０内の遺伝子に部位特異的変異を誘発するため、ＱＵＩＫＣＨＡＮＧＥ（登録商標）Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキットを用いた。このアプローチによって作製した変異体によってＢ１２１－ＤＥ３＊細胞を形質転換させ、ＬＢ培地中で飽和状態まで増殖させた。次に一定分量を、様々な量のテンボトリオンを含むＬＢ寒天プレート上にスポットした。この方法によれば、プレート上でおおよそ２４時間増殖させた後、活性のあるＨＰＰＤ酵素は茶色の色素を生成する。このアッセイを用いることにより、作製したすべての変異体が、テンボトリオンによる阻害に対する抵抗性の高いＨＰＰＤ活性を有することが示された。

【０２３６】

ＨＰＰＤ共役法を用いて、変異体のテンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトール）、およびメソトリオンに対する耐性もまた測定した。結果を表１４に示す。「≫」は、測定の範囲外であるが、その後に示す数値よりもかなり大きな数値であることを意味する。

【０２３７】

【表１４】

	pI_{50} テンボトリオン	pI_{50} ジケトニトリル	pI_{50} メソトリオン	Km (μM)
PfG336W	6.4	5.8	5.8	187
PfHPPDEvo40	6.2	4.2	4.8	509
PfHPPDEvo41	5.6	4.2	4.3	336
Axmi305H	6.7	6.5	6.7	116
Axmi305H-Evo40	5.8	5.5	5.3	721
Axmi305H-Evo41	6.8	5.0	5.2	816
Axmi309H	6.4	6.4	6.1	318
Axmi309H-Evo40	5.9	4.4	5.2	290
Axmi309H-Evo41	6.2	4.5	4.7	807
Axmi428H	7.2	7.0	6.7	47
Axmi428H-Evo40	6.1	5.2	5.5	1490
Axmi428H-Evo41	5.6	4.3	5	>>1000

【０２３８】

表１４のデータは、本明細書で同定した変異または変異の組み合わせが、導入されたＨＰＰＤタンパク質の性質に関わらず、ＨＰＰＤ阻害剤に対する耐性の改善に効果的に関与することを示している。

【０２３９】

実施例８：植物発現カセット内へのＨＰＰＤ遺伝子のクローニング

本明細書に記載するＨＰＰＤ遺伝子それぞれにつき、翻訳領域（ＯＲＦ）は完全長ＤＮＡの鋳型からＰＣＲによって増幅されてよい。ＰＣＲを行う間、各ＯＲＦの末端

92

にＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素部位が付加されてもよい。さらに、翻訳効率を増大させるため、遺伝子の開始コドン直上の５’側に、ヌクレオチド配列ＡＣＣを付加してもよい（Ｋｏｚａｋ（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １５：８１２５－８１４８；Ｊｏｓｈｉ（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １５：６６４３－６６５３）。ＰＣＲ産物は、ＰＣＲを行った間に変異が導入されていないことを確認するため、当該技術分野において公知の技術を用いてクローン化および配列決定を行ってよい。

【０２４０】

ＰＣＲ産物を含むプラスミドはＨｉｎｄＩＩＩによって消化されてよく、これによって未変化のＯＲＦを含む断片が分離され得る。この断片は、プラスミド、例えば米アクチンプロモーター（ＭｃＥｌｒｏｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｍｏｌｅｃ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２３１：１５０－１６０）およびＰｉｎＩＩターミネーター（Ａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：１１５－１２２）を含む植物発現ベクターであるｐＡＸ２００のＨｉｎｄ ＩＩＩ部位内へクローン化されてよい。この中間体プラスミドからのプロモーター－遺伝子－ターミネーター断片は、プラスミドｐＳＢ１１（日本たばこ産業株式会社）内へサブクローン化してよく、これによって最終的なｐＳＢ１１ベースのプラスミドが形成される。これらのｐＳＢ１１ベースのプラスミドは、典型的には、プロモーター－遺伝子－ターミネーターコンストラクトを含むＤＮＡ断片が、ＫｐｎＩおよびＰｍｅＩのような制限酵素を用いた二重消化によって切り出され、エアロゾルビーム注入によって植物を形質転換するために用いられるように構築される。得られたｐＳＢ１１ベースのクローンの構造は、制限酵素による消化およびゲル電気泳動、ならびに様々なクローニングジャンクションにまたがった配列決定によって確認され得る。

【０２４１】

該プラスミドは、プラスミドｐＳＢ１（日本たばこ産業株式会社）を有しているアグロバクテリウム・ツメファシエンス株であるＬＢＡ４４０４内へ、当該技術分野において公知である三親接合の手順を用いて導入した後、スペクチノマイシンを含む培地にまいてよい。ｐＳＢ１１ベースのプラスミドクローンはスペクチノマイシン抵抗性ではあるが、宿主範囲の狭いプラスミドであり、アグロバクテリウム内では複製できない。ｐＳＢ１１ベースのプラスミドを、相同組換えを通して宿主範囲の広いプラスミドであるｐＳＢ１に組み込むと、スペクチノマイシン抵抗性のコロニーが出現する。ｐＳＢ１とｐＳＢ１１ベースのプラスミドとの同時組み込みによる産物は、サザンハイブリダイゼーションによって確認してよい。同時組み込みされたアグロバクテリウム株は、当該技術分野において公知の方法、例えばＰｕｒｅｌｎｔｒｏ

93

法（日本たばこ産業株式会社）によって、トウモロコシを形質転換させるために用いてよい。

【０２４２】

実施例９：大豆の形質転換

大豆の形質転換は、当該技術分野において公知の方法、例えば記載されている方法で、基本的にはＰａｚ　ｅｔ　ａｌ．（２００６），Ｐｌａｎｔ　ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２５：２０６に記載される方法によるアグロバクテリウム・ツメファシエンスを介した大豆半種子外植体の形質転換を用いる方法によって行われる。形質転換体は、選択マーカーとしてイソキサフルトールまたはテンボトリオンを用いて同定した。グリーンシュートの出現を観察し、除草剤であるイソキサフルトールまたはテンボトリオンに対する耐性の指標として記録した。耐性のトランスジェニックシュートは、イソキサフルトールまたはテンボトリオンによって処理していない野生型大豆シュートと同等の正常な緑色を示すが、同量のイソキサフルトールまたはテンボトリオンによって処理した野生型大豆シュートは完全に白化する。このことは、ＨＰＰＤタンパク質が存在すると、イソキサフルトールまたはテンボトリオンのようなＨＰＰＤ阻害除草剤に対して耐性となることを示している。

【０２４３】

耐性のグリーンシュートは、発根培地に移されるか、または移植される。根付いた小植物は、順応期間後に温室へ移される。導入遺伝子を含む植物には、次にＨＰＰＤ阻害除草剤、例えばテンボトリオンを１００ｇ　ＡＩ／ｈａの比率においてスプレーする。使用後１０日目に、除草剤の使用による徴候を評価し、同じ条件下で野生型植物に観察される徴候と比較する。

【０２４４】

実施例１０：綿Ｔ０植物の樹立および選択

綿の形質転換は、当該技術分野において公知の方法、特に好ましくはＰＣＴ国際公開第００／７１７３３号に記載される方法を用いて行われる。再生した植物は温室に移される。順応期間後、十分に成長した植物に、ＨＰＰＤ阻害除草剤、例えば硫酸アンモニウムおよび菜種油メチルエステルを加えたテンボトリオンを１００ｇ　ＡＩ／ｈａにてスプレーする。スプレー後７日目に、除草剤

94

を用いた処理による徴候を評価し、同じ条件下で同じ処理を施した野生型綿植物に観察される徴候と比較する。

【０２４５】

実施例１１：アグロバクテリウムを介した形質転換による、トウモロコシ植物細胞の形質転換

受粉後８～１２日に穂を最適な状態で収穫する。穂から胚を分離するが、これらの胚を形質転換に用いるためには大きさ０．８～１．５mmであることが好ましい。胚盤側を上にして、胚を適切なインキュベーション培地にまき、暗所で２５℃にて一晩インキュベートする。

【０２４６】

しかしながら本来、胚を一晩インキュベートする必要はない。Ｔｉプラスミドを介した移入のため、胚を、本発明のヌクレオチド配列を有する適切なベクターを含むアグロバクテリウム株に約５～１０分間接触させた後、共培養培地上にまいて、約３日間培養する（暗所で２５℃）。共培養後、外植体を回復期間用の培地に約５日間移す（暗所で２５℃）。使用する特定の選択方法の性質および特性に従い、外植体を選択培地中で最長８週間インキュベートする。選択期間後に得られたカルスを、成熟した体細胞胚の形成が観察されるまで胚成熟用の培地に移す。次に、得られた成熟体細胞胚を微光下に置き、当該技術分野において公知の再生過程を開始させる。得られたシュートを発根培地中で根付かせた後、得られた植物を苗床に移して、トランスジェニック植物として繁殖させる。

【０２４７】

本明細書で言及したすべての刊行物および特許出願は、本発明に関係する当業者の技術水準を示すものである。すべての刊行物および特許出願は、刊行物または特許出願それぞれが、具体的かつ個別に参照として取り込まれるよう指示された場合と同じ範囲によって、本明細書に参照として取り込まれる。

【０２４８】

前述の発明は、明確な理解のための例証および実例を目的としてある程度詳細に記載しているが、添付の請求項の範囲内で特定の変更および改変が行われてよいことは明らかであろう。

【図１Ａ】

蛍光菌
エンバク
エンバク
トウモロコシ
ストレプトマイセス・アベルミティリス
シロイヌナズナ
オオムギ
ニンジン
コムギ葉枯病菌
コクシジオイデス・イミティス

【図１Ｂ】

蛍光菌
エンバク
エンバク
トウモロコシ
ストレプトマイセス・アベルミティリス
シロイヌナズナ
オオムギ
ニンジン
コムギ葉枯病菌
コクシジオイデス・イミティス

【図１Ｃ】

蛍光菌
エンバク
エンバク
トウモロコシ
ストレプトマイセス・アベルミティリス
シロイヌナズナ
オオムギ
ニンジン
コムギ葉枯病菌
コクシジオイデス・イミティス

【配列表】
2015528310000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/059598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/02 C12N15/82
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 453 012 A1 (BAYER CROPSCIENCE AG [DE]) 16 May 2012 (2012-05-16) abstract paragraph [0055] paragraph [0066] paragraph [0072] paragraph [0073] paragraph [0083] paragraph [0089] - paragraph [0090] paragraph [0091] -----	1-34
A	WO 2009/144079 A1 (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]; BAYER CROPSCIENCE AG [DE]; BUSCH MARCO [DE];) 3 December 2009 (2009-12-03) abstract page 5, line 8 - line 33 page 13, line 9 - line 30 ----- -/--	1-34

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 November 2013	11/02/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mundel, Christophe

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/059598

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/053557 A1 (MS TECHNOLOGIES LLC [US]; SEKAR VAITHILINGAM [US]; HELD BRUCE [US]; CH) 5 May 2011 (2011-05-05) the whole document	1-34

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/059598

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/059598

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-34(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2013/059598

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-34(partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for tryptophan, glycine or serine at a position corresponding to amino acid 188 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for tryptophan, glycine or serine at a position corresponding to position 188 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

2. claims: 1, 3, 6-17, 22-34(all partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for serine, cysteine or arginine at a position corresponding to amino acid 189 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for serine, cysteine or arginine at a position corresponding to position 189 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

3. claims: 1-34(partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for proline, serine, histidine, alanine, glycine or glutamine at a position corresponding to amino acid 335 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for proline,

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

serine, histidine, alanine, glycine or glutamine at a position corresponding to position 335 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

4. claims: 1-34(partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for serine or tryptophan at a position corresponding to amino acid 336 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for serine or tryptophan at a position corresponding to position 336 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

5. claims: 1-4, 6-20, 22-34(all partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for threonine, alanine or serine at a position corresponding to amino acid 339 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for threonine, alanine or serine at a position corresponding to position 339 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

6. claims: 1-4, 6-20, 22-34(all partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for glutamine, alanine,

International Application No. PCT/ US2013/ 059598

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

valine or glutamic acid at a position corresponding to amino acid 340 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for glutamine, alanine, valine or glutamic acid at a position corresponding to position 340 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

---

7. claims: 1, 3, 6-17, 22-34(all partially)

A recombinant nucleic acid molecule encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and having at least an amino acid substitution for leucine at a position corresponding to amino acid 215 of SEQ ID NO: 1. A vector, host cell, transgenic plant or transgenic seed comprising said nucleic acid. A recombinant polypeptide comprising an HPPD enzyme having at least 55% sequence identity to SEQ ID NO: 1 and comprising an amino acid substitution for leucine at a position corresponding to position 215 of SEQ ID NO: 1. Use of the polypeptide/polynucleotide for the generation of transgenic plants tolerant to an HPPD inhibitor herbicide. A commodity product comprising a detectable amount of the nucleic acid or the polypeptide. A method of controlling weeds in a field comprising the transgenic plant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/059598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2453012 A1	16-05-2012	EP 2453012 A1	16-05-2012
		EP 2669369 A1	04-12-2013
		EP 2669370 A1	04-12-2013
		EP 2669371 A1	04-12-2013
		EP 2669372 A1	04-12-2013
		EP 2669373 A1	04-12-2013
WO 2009144079 A1	03-12-2009	AR 071316 A1	09-06-2010
		CA 2724670 A1	03-12-2009
		CN 101998993 A	30-03-2011
		EP 2268815 A1	05-01-2011
		US 2011039706 A1	17-02-2011
		WO 2009144079 A1	03-12-2009
WO 2011053557 A1	05-05-2011	AR 078813 A1	07-12-2011
		CA 2774441 A1	05-05-2011
		EP 2493931 A1	05-09-2012
		US 2011104755 A1	05-05-2011
		WO 2011053557 A1	05-05-2011

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　9/04　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ　9/04	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ

(74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋
(74)代理人 100188651
弁理士 遠藤 広介
(72)発明者 ファビアン、ポレ
ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、マイン、ドゥナントリング、８９
(72)発明者 フォルカー、ハインリッヒス
ドイツ連邦共和国ベーデマルク、ファルンベーク、１０
(72)発明者 グードルン、ランゲ
ドイツ連邦共和国ケルクハイム、アム、バルデック、５１
(72)発明者 ベルント、ラバー
ドイツ連邦共和国イトシュタイン、グラーフ－フォン－シュタウフェンベルク－シュトラーセ、１２
(72)発明者 シェリル、ピータース
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ローリー、バリー、エステーツ、ドライブ、６３０８
(72)発明者 ローラ、スハウテン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ピッツボロ、ホーリー、リッジ、ロード、７１

Ｆターム(参考) 2B030 AD05 CA17
4B024 AA08 BA08 CA01 CA12 DA01 DA05 EA04 GA11
4B050 CC04 LL10
4B064 AG01 CA19 CC24 DA12
4B065 AA01X AA89X AB01 BA02 CA28 CA53